

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 1 006 189 A2

A 10

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
07.06.2000 Patentblatt 2000/23
(21) Anmeldenummer: 99123738.9
(22) Anmeldetag: 30.11.1999

(51) Int. Cl.⁷: C12N 15/52, C12N 15/54,
C12N 15/60, C12N 15/77,
C12P 13/02
// C12N1/21, (C12R1/15, 1:19)

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI
(30) Priorität: 01.12.1998 DE 19855312
(71) Anmelder:
• Degussa-Hüls Aktiengesellschaft
60287 Frankfurt am Main (DE)

• FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH
52425 Jülich (DE)

(72) Erfinder:
• Eggeling, Lothar, Dr.
52428 Jülich (DE)
• Thierbach, Georg, Dr.
33613 Bielefeld (DE)
• Sahm, Herrmann, Prof.Dr.
52428 Jülich (DE)

(54) Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothenäure unter Verwendung coryneformer Bakterien

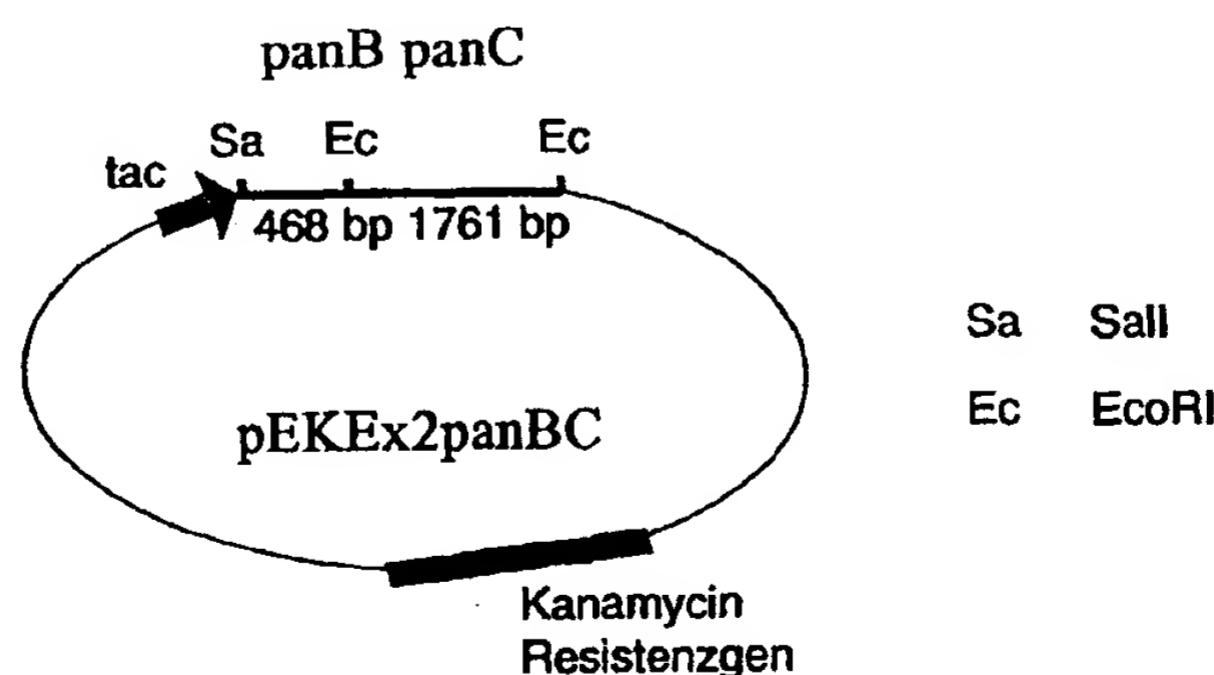
(57) Die Erfindung betrifft in Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium* replizierbare, gegebenenfalls rekombinante DNA mit der Herkunft *Corynebacterium*, die zumindest eine der folgenden Nucleotidsequenzen enthält, ausgewählt aus der Gruppe:

- a) codierend für das panB-Gen (Ketopantoathydroxymethyltransferase), dargestellt in der SEQ-ID-No.1,
- b) codierend für das panC-Gen (Pantothenatsyn-

thetase), dargestellt in der SEQ-ID-No.1, insbesondere das panBC-Operon und gegebenenfalls c) codierend für das ilvD-Gen (Dihydroxysäuredehydratase), dargestellt durch die SEQ-ID-No.4,

und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothenäure unter Verwendung von Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium*, in denen die genannten Gene verstärkt werden.

Abbildung 2



EP 1 006 189 A2

Beschreibung

Stand der Technik

5 [0001] Die Pantothenäure stellt ein kommerziell bedeutendes Vitamin dar, das in der Kosmetik, der Medizin, der Humanernährung und in der Tierernährung Anwendung findet.

[0002] Pantothenäure kann durch chemische Synthese oder biotechnologisch durch Fermentation geeigneter Mikroorganismen in geeigneten Nährösungen hergestellt werden. Der Vorteil der biotechnologischen Herstellung durch Mikroorganismen liegt in der Bildung der gewünschten stereo-isomeren D-Form der Pantothenäure.

10 [0003] Verschiedene Arten von Bakterien, wie z. B. *Escherichia coli*, *Corynebacterium erythrogenes*, *Brevibacterium ammoniagenes* und auch Hefen, wie z. B. *Debaromyces castellii* können, wie in EP-A 0 493 060 gezeigt, in einer Nährösung, die Glucose, DL-Pantoinsäure und β -Alanin enthält, D-Pantothenäure produzieren. EP-A 0 493 060 zeigt weiterhin, daß bei *Escherichia coli* durch Amplifikation von Pantothenäure-Biosynthesegenen mittels der Plasmide pFV3 und pFV5 die Bildung von D-Pantothenäure verbessert wird.

15 [0004] EP-A 0 590 857 betrifft Stämme von *Escherichia coli*, die Resistenzen gegen verschiedene Antimetabolite, wie z. B. Salizylsäure, α -Ketobuttersäure, β -Hydroxyasparaginsäure etc. tragen und in einer Nährösung, die Glucose und β -Alanin enthält, D-Pantoinsäure und D-Pantothenäure produzieren. In EP-A 0 590 857 wird weiterhin beschrieben, daß durch Amplifikation von nicht näher definierten Pantothenäure-Biosynthesegenen aus *E. coli*, die auf dem Plasmid pFV31 enthalten sind, die Produktion von D-Pantoinsäure und D-Pantothenäure in *E. coli* verbessert werden kann.

20 [0005] In WO 97/10340 wird darüber hinaus gezeigt, daß in Pantothenäure bildenden Mutanten von *Escherichia coli* durch Erhöhung der Aktivität des Enzyms Acetohydroxysäure-Synthase II, einem Enzym der Valin Biosynthese, die Pantothenäure-Produktion weiter gesteigert werden kann.

Aufgabe der Erfindung

25 [0006] Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt neue Grundlagen für verbesserte Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothenäure mit Hilfe coryneformer Bakterien bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

30 [0007] Das Vitamin Pantothenäure stellt ein kommerziell bedeutendes Produkt dar, das in der Kosmetik, der Medizin, der Humanernährung und in der Tierernährung Anwendung findet. Es besteht daher ein allgemeines Interesse daran verbesserte Verfahren zur Herstellung von Pantothenäure bereitzustellen.

Wenn im folgenden Text D-Pantothenäure oder Pantothenäure oder Pantothenat erwähnt werden, sind damit nicht 35 nur die freie Säure, sondern auch die Salze der D-Pantothenäure wie z.B. das Calcium-, Natrium-, Ammonium- oder Kaliumsalz gemeint.

Gegenstand der Erfindung sind in Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium* replizierbare, gegebenenfalls rekombinante DNA mit der Herkunft *Corynebacterium*, die zumindest eine der folgenden Nucleotidsequenzen enthält, ausgewählt aus der Gruppe:

40 a) codierend für das panB-Gen (Ketopantoathydroxymethyltransferase), dargestellt in der SEQ-ID-No.1,
b) codierend für das panC-Gen (Pantothenatsynthetase), dargestellt in der SEQ-ID-No.1, insbesondere das panBC-Operon und gegebenenfalls
c) codierend für das ilvD-Gen (Dihydroxysäuredehydratase), dargestellt durch die SEQ-ID-No.4.

45 [0008] Gegenstand der Erfindung sind ebenso replizierbare DNA gemäß dem genannten Anspruch 1 mit:

50 (i) den Nucleotidsequenzen, gezeigt in SEQ-ID-No.1, SEQ-ID-No.4,
(ii) mindestens einer dieser Sequenzen, die den jeweiligen Sequenzen (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes entsprechen oder
(iii) mindestens einer dieser Sequenzen, die mit den zu jeweiligen Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen hybridisieren und gegebenenfalls
(iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).

55 [0009] Ebenso werden beansprucht coryneforme Mikroorganismen, insbesondere der Gattung *Corynebacterium*, transformiert durch die Einführung einer oder mehrerer replizierbarer DNA-Stücke.
Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung von D-Pantothenäure unter Verwendung, insbesond-

ere diese Säure bereits produzierender coryneformer Bakterien, in denen die Gene *panB* und *panC* einzeln oder kombiniert miteinander gegebenenfalls kombiniert mit einer Defektmutation im *ilvA*-Gen oder einer Verstärkung der Gene *ilvBN*, *ilvC* oder *ilvD* verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

[0010] Der Begriff „Verstärkung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man z. B. die Kopienzahl des(der) Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

[0011] Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können Pantotheninsäure aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen, insbesondere aus Glucose oder Saccharose. Es handelt sich um coryneforme Bakterien z. B. der Gattungen *Corynebacterium* oder *Arthrobacter*. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt, ist Aminosäuren zu bilden. Zu dieser Art gehören Wildtypstämme wie z. B. *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, *Brevibacterium flavum* ATCC14067, *Corynebacterium melassecola* ATCC17965 und davon abgeleitete Stämme.

[0012] Die Erfinder fanden heraus, dass nach Verstärkung, insbesondere Überexpression, der neu isolierten D-Pantothenatbiosynthesegene *panB* und *panC* einzeln oder gemeinsam (*panBC*-Operon) aus *Corynebacterium glutamicum*, die für die Enzyme Ketopantoathydroxymethyltransferase und Pantothenatesynthetase kodieren, in verbesserter Weise D-Pantothenat produziert wird.

[0013] Die Erfinder haben weiter festgestellt, daß eine verstärkte Expression des neuen Valinbiosynthesegens *ilvD* aus *Corynebacterium glutamicum*, welches für das Enzym Dihydroxysäuredehydratase kodiert, zur erhöhten D-Pantothenatbildung beiträgt. Erfindungsgemäß bewirken neben diesem Gen auch die verstärkte Expression der *ilvBN*-Gene, die für das Enzym Acetohydroxysäuresynthase kodieren, und des *ilvC*-Gens, das für das Enzym Isomeroreduktase kodiert, in *Corynebacterium glutamicum* eine erhöhte D-Pantothenatbildung.

[0014] Zur Erzielung einer Verstärkung (Überexpression) erhöht man z. B. die Kopienzahl der entsprechenden Gene oder mutiert die Promotor- und Regulationsregion, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich die Expression im Verlaufe der fermentativen D-Pantothenatbildung zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte liegen dabei entweder in Plasmidvektoren mit unterschiedlicher Kopienzahl vor oder sind im Chromosom integriert und amplifiziert. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden. Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift EPS 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)) oder im Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

[0015] Zur Isolierung der Gene *panB* und *panC* aus *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in *E. coli* angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990) oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine bekannte Genbank ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in λ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im *E. coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde. Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC19 (Norlander et al., 1983, Gene, 26: 101-106) verwendet werden. Als Wirt eignen sich besonders solche *E. coli*-Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 α mcr, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde.

[0016] Die Genbank wird anschließend in einen Indikatorstamm durch Transformation (Hanahan, Journal of Molecular Biology 166, 557-580, 1983) oder Elektroporation (Tauch et al., 1994, FEMS Microbiological Letters, 123:343-347) eingebaut. Der Indikatorstamm zeichnet sich dadurch aus, dass er eine Mutation in dem interessierenden Gen besitzt, die einen detektierbaren Phänotyp z.B. eine Auxotrophie hervorruft. Die Indikatorstämme bzw. Mutanten sind aus publizierten Quellen oder Stammsammlungen erhältlich oder werden gegebenenfalls selbst hergestellt. Im Rahmen

der vorliegenden Erfindung ist die *E. coli* Mutante DV39 (Vallari und Rock, *Journal of Bacteriology* 1985, 164:136-142), die eine Mutation im panC-Gen trägt, von besonderem Interesse. Ein anderes Beispiel für eine Pantothenäure-bedürftige *E. coli* Mutante ist der Stamm SJ2, der eine Mutation im panB-Gen trägt und vom Genetic Stock Center der Yale University (New Haven, Connecticut, USA) bezogen werden kann. Ein weiteres Beispiel ist die im Rahmen der vorliegenden Erfindung isolierte *C. glutamicum* Mutante R127/7, die in dem für die Dihydroxysäuredehydratase kodierendem ilvD-Gen defekt ist. Nach Transformation des Indikatorstammes wie z.B. der panB-Mutante SJ2 mit einem rekombinanten Plasmid, welches das interessierende Gen wie z.B. das panB-Gen trägt, und Expression des betreffenden Gens, wird der Indikatorstamm bezüglich der entsprechenden Eigenschaft wie z.B. der Pantothenäure-Bedürftigkeit prototroph.

5 [0017] Das dergestalt isolierte Gen bzw. DNA-Fragment kann durch Bestimmung der Sequenz, wie z.B. bei Sanger et al. (*Proceedings of the National of Sciences of the United States of America USA*, 74:5463-5467, 1977) beschrieben, charakterisiert werden.

[0018] Auf diese Weise wurde die neue für die Gene panB und panC kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* erhalten, die als SEQ ID NO 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurden aus der vorliegenden DNA-15 Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenzen der entsprechenden Enzyme abgeleitet. In SEQ ID NO 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des panB-Genproduktes nämlich der Ketopantoathydroxymethyltransferase und in SEQ ID NO 3 die sich ergebende Aminosäuresequenz des panC-Genproduktes nämlich der Pantothenatsynthetase dargestellt. Weiterhin wurde auf diese Weise die neue für das ilvD-Gen kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* erhalten, die als SEQ ID NO 4 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. In SEQ ID NO 20 5 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des ilvD-Genproduktes nämlich der Dihydroxysäuredehydratase dargestellt.

[0019] Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID NO 1 und/oder SEQ ID NO 4 durch einen degenerierten genetischen Code ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID NO 1 und/oder SEQ ID NO 4 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (*Journal of Bacteriology* 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (*Gene* 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (*Protein Sciences* 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (*Bio/Technology* 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3 und/oder SEQ ID NO 5 ergeben sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

[0020] Das dergestalt charakterisierte Gen kann anschließend einzeln oder in Kombination mit anderen in einem geeigneten Mikroorganismus zur Expression gebracht werden. Eine bekannte Methode Gene zu exprimieren bzw. überzuprimeren besteht darin diese mit Hilfe von Plasmidvektoren zu amplifizieren, die überdies mit Expressionssignalen ausgestattet sein können. Als Plasmidvektoren kommen solche in Frage, die in den entsprechenden Mikroorganismen replizieren können. Für *Corynebacterium glutamicum* kommen z.B. die Vektoren pEKEx1 (Eikmanns et al., *Gene* 102:93-98 (1991)) oder pZ8-1 (Europäische Patentschrift 0 375 889) oder pEKEx2 (Eikmanns et al. *Microbiology* 140: 1817-1828 (1994) oder pECM2 (Jäger et al. *Journal of Bacteriology* 174(16): 5462-5465 (1992)) in Frage. Beispiele für derartige Plasmide sind pEKEx2panBC und pECM3ilvBNCD, die in den Stämmen DH5 α mcr/pEKEx2panBC und DH5 α mcr/pECM3ilvBNCD enthalten sind. Plasmid pEKEx2panBC ist ein *E. coli*/*C. glutamicum* Pendelvektor der die Gene panB und panC trägt. Plasmid pECM3ilvBNCD ist ein *E. coli*/*C. glutamicum* Pendelvektor der neben dem ilvD-Gen weiterhin die Gene ilvBN und ilvC trägt.

40 45 [0021] Die Erfinder haben weiterhin gefunden, dass sich die Verstärkung der Gene panB und panC einzeln, gemeinsam oder in Kombination mit den Genen ilvBN, ilvC und ilvD in solchen Mikroorganismen vorteilhaft auswirkt, die eine reduzierte Synthese der Aminosäuren Threonin und Isoleucin aufweisen. Diese reduzierte Synthese kann durch Abschwächung oder Ausschaltung der entsprechenden Biosynthetesenzyme bzw. ihrer Aktivitäten erreicht werden. Hierfür kommen zum Beispiel die Enzyme Homoserindehydrogenase, Homoserinkinase, Threoninsynthase oder auch Threonindehydratase in Frage. Eine Möglichkeit Enzyme und deren Aktivitäten abzuschwächen oder auszuschalten sind Mutageneseverfahren.

[0022] Hierzu gehören ungerichtete Verfahren, die chemische Reagenzien wie z.B. N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin oder auch UV-Bestrahlung zur Mutagenese benutzen, mit anschließender Suche der gewünschten Mikroorganismen auf Bedürftigkeit für L-Threonin oder L-Isoleucin. Verfahren zur Mutationsauslösung und Mutantensuche sind allgemein bekannt und können unter anderem bei Miller (*A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992)) oder im Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology“ der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 50 55 1981) nachgelesen werden.

[0023] Weiterhin gehören hierzu gerichtete rekombinante DNA-Techniken. Mit Hilfe dieser Methoden kann zum Beispiel das für die Threonindehydrolase kodierende *ilvA*-Gen im Chromosom deletiert werden. Geeignete Methoden dazu sind bei Schäfer et al. (Gene (1994) 145: 69-73) oder auch Link et al. (Journal of Bacteriology (1998) 179: 6228-6237) beschrieben. Auch können nur Teile des Gens deletiert werden, oder auch mutierte Fragmente des Threonindehydrolasegens ausgetauscht werden. Durch Deletion oder Austausch wird so ein Verlust oder eine Reduktion der Threonindehydrolaseaktivität erreicht (Möckel et al., (1994) Molecular Microbiology 13: 833-842; Morbach et al., (1996) Applied Microbiology and Biotechnology 45: 612-620). Ein Beispiel für eine derartige Mutante ist der *C. glutamicum* Stamm ATCC13032Δ*ilvA*, der eine Deletion im *ilvA*-Gen trägt.

[0024] Die erfundungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch-Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Pantotheninsäure-Produktion kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

[0025] Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Mikroorganismen genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedenster Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Phosphorquelle können Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies zur zusätzlichen Steigerung der Pantotheninsäure-Produktion Vorstufen der Pantotheninsäure wie z. B. Aspartat, β-Alanin; Ketolsovalerat, Ketopantoat, Pantoat und gegebenenfalls deren Salze zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

[0026] Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 50°C und vorzugsweise bei 25°C bis 45°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt bis sich ein Maximum an Pantotheninsäure gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

[0027] Die Konzentration an gebildeter Pantotheninsäure kann mit bekannten Verfahren (Velisek; Chromatographic Science 60, 515-560 (1992)) bestimmt werden. Zur mikrobiologischen Bestimmung von Pantotheninsäure wird gebräuchlicherweise der Stamm *Lactobacillus plantarum* ATCC8014 eingesetzt (U.S. Pharmacopeia 1980; AOAC International 1980). Darüberhinaus werden auch andere Testorganismen, wie z.B. *Pediococcus acidilactici* NCIB6990 zur mikrobiologischen Bestimmung von Pantothenatkonzentrationen eingesetzt (Sollberg and Hegna; Methods in Enzymology 62, 201-204 (1979)).

[0028] Folgende Mikroorganismen wurden bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapest Vertrag hinterlegt:

[50] • *Escherichia coli* K12 Stamm DH5αmcr/pEKEx2panBC als DSM12456
 • *Escherichia coli* K12 Stamm DH5αmcr/pECM3ilvBNCD als DSM12457
 • *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032Δ*ilvA* als DSM12455

Beispiele

[55] [0029] Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Beispiel 1

Klonierung, Sequenzierung und Expression der Gene der Pantothenatbiosynthese panB und panC aus *C. glutamicum*

5 1. Klonierung des panB- und des panC-Gens

[0030] Chromosomal DNA von *C. glutamicum* ATCC13032 wurde wie bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9 (1990) 84-87) beschrieben isoliert und mit der Restriktionsendonuklease Sau3A geschnitten. Nach gelektrophoretischer Auftrennung wurden DNA-Fragmente in einem Größenbereich von 3 bis 7 kb bzw. von 9 bis 20 kb extrahiert und nachfolgend in die singuläre BamHI Schnittstelle des Vektors pBR322 ligiert. Mit den Ligationsansätzen wurde der *E. coli* Stamm DH5 α mcr (Grant et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA, 87 (1990) 4645-4649) transformiert (Hanahan, Journal of Molecular Biology 166 (1983) 557-580). Inserttragende Kolonien wurden anhand ihrer Tetracyclinsensitivität nach Überimpfen auf 10 μ g/ml Tetracyclin enthaltende LB-Agarplatten identifiziert. Durch Plasmidpräparationen (Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press) von vereinigten Klonen wurden 8 Gruppen, welche je 400 Plasmide mit einer Insertgröße von 9 bis 20 kb und 9 Gruppen, welche je 500 Plasmide mit einer Insertgröße von 3 bis 7 kb enthielten isoliert. Die *E. coli* panB Mutante SJ2 (Cronan et al. 1982, Journal of Bacteriology 149: 916-922) wurde mit dieser Genbank mittels Elektroporation (Wehrmann et al. 1994, Microbiology 140: 3349-3356) transformiert. Die Transformationsansätze wurden direkt auf CGXII-Medium mit 15 g/l Agar (Keilhauer et al., Journal of Bacteriology (1993) 175: 5595-5603) ausplattiert. Von Klonen, welche in der Lage waren ohne Pantothenatsupplementation zu wachsen, wurde Plasmid-DNA isoliert (Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press). Bei 8 Plasmiden konnte durch Retransformation die Fähigkeit, den panB-Defekt der *E. coli* Mutante SJ2 heterolog zu komplementieren, bestätigt werden.

[0031] Mit diesen 8 Plasmiden wurde eine Restriktionskartierung durchgeführt. Einer der untersuchten Plasmidvektoren, im Folgendem pUR1 genannt enthielt ein Insert von 9,3 kb Länge (Abbildung 1). Die Transformation der *E. coli* panC Mutante DV39 (Vallari und Rock 1985, Journal of Bacteriology 164: 136-142) ergab, daß der Vektor pUR1 ebenfalls in der Lage war den panC Defekt dieser Mutante zu komplementieren.

30 2. Sequenzierung des panB- und des panC-Gens

[0032] Ein 2,2 kb großes Fragment des Inserts (Abbildung 1) von pUR1 wurde nach der Dideoxy-Kettenabbruchmethode von Sanger et al. sequenziert (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA (1977) 74: 5463-5467). Hierzu wurden zunächst mittels Exonuklease III Subklone erzeugt, die mit Hilfe von Standard Primern (Universal und reverse primer der Firma Boehringer Mannheim, Deutschland) sequenziert wurden. Die gelektrophoretische Analyse der Sequenzieransätze erfolgte mit dem automatischen Laser-Fluoreszenz Sequenziergerät (A.L.F.) von Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden). Die erhaltene Nukleotidsequenz wurde mit dem Programm Paket HUSAR (Release 4.0, EMBL, Cambridge, GB) analysiert. Die Nukleotidsequenz ist als SEQ ID NO 1 wiedergegeben. Die Analyse ergab die Identifizierung von zwei offenen Leserastern. Ein offenes Leseraster von 813 bp Länge, das als panB-Gen identifiziert wurde, kodiert für ein Polypeptid von 271 Aminosäuren und ist als SEQ ID NO 2 wiedergegeben. Das zweite offene Leseraster, das als panC-Gen identifiziert wurde, umfaßt 837 Basenpaare. Es kodiert für ein Polypeptid von 279 Aminosäuren, das als SEQ ID NO 3 wiedergegeben ist.

3. Expression des panB- und des panC-Gens

[0033] Die Gene panB und panC wurden in den *C. glutamicum* Expressionsvektor pEKEx2 kloniert (Eikmanns et al. 1994, Microbiology 140: 1817-1828 (1994)), in welchem die beiden Gene unter der Kontrolle des starken, durch IPTG induzierbaren tac-Promotors vorliegen. Die Klonierung wurde in zwei Schritten durchgeführt. Zunächst wurde mittels PCR der Anfang des panB Gens amplifiziert. Hierzu wurde mit Hilfe eines entsprechenden Primers 19 bp vor dem Startcodon von panB eine SalI-Schnittstelle eingefügt (Primer 1: 5'GATCGTCGACCACATCTATACT-CATGCC 3'). Der zweite Primer wurde so gewählt, daß die panB interne EcoRI Schnittstelle im amplifizierten Fragment enthalten war (Primer 2: 5'ACCCG ATGTGGCCGACAACC 3'). Die PCR wurde mit einer Annealingtemperatur von 62°C und dem Plasmid pUR1 als Matrize nach Sambrook et al. (Molecular cloning. A laboratory manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989)) durchgeführt. Das resultierende 468 bp große PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsendonukleasen SalI und EcoRI geschnitten und in den ebenso behandelten Vektor pEKEx2 ligiert. Mit dem Ligationsansatz wurde der *E. coli* Stamm DH5 α mcr transformiert. Aus einer Transformante vom Typ DH5 α mcr/pEKEx2panB' wurde der Vektor pEKEx2panB' isoliert.

[0034] Aus dem Plasmid pUR1 wurde nun ein 1761 bp großes, die zweite Hälfte des panBC-Clusters enthaltendes, EcoRI Fragment mittels Restriktionsverdau ausgeschnitten. Dieses wurde in den schon das panB PCR-Produkt enthal-

tenden, zuvor mit EcoRI linearisierten pEKEx2panB' Vektor kloniert. Mit dem entsprechenden Ligationsansatz wurde der *E. coli* Stamm DH5 α mcR transformiert. Aus einer Transformante vom Typ DH5 α mcR/pEKEx2panBC wurde der Vektor pEKEx2panBC (Abbildung 2) isoliert, in dem das panBC-Gencluster unter der Kontrolle des tac-Promotors vorliegt.

5 Beispiel 2

Klonierung und Sequenzierung des für die Dihydroxysäuredehydratase kodierenden ilvD-Gens aus *C. glutamicum*

1. Isolierung einer ilvD Mutante von *C. glutamicum*

[0035] Der Stamm *C. glutamicum* R127 (Haynes 1989, FEMS Microbiology Letters 61: 329-334) wurde mit N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin mutagenisiert (Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press). Dazu wurden 5 ml einer über Nacht angezogenen *C. glutamicum* Kultur mit 250 μ l N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin (5 mg/ml Dimethylformamid) versetzt und 30 Minuten bei 30°C und 200 Upm inkubiert (Adelberg 1958, Journal of Bacteriology 76: 326). Die Zellen wurden anschließend zweimal mit steriler NaCl-Lösung (0,9 %) gewaschen. Durch Replikaplatzierung auf Minimalmediumplatten CGXII mit 15 g/l Agar (Keilhauer et al. Journal of Bacteriology 175: 5595-5603), wurden Mutanten isoliert, die nur bei Zugabe von L-Valin, L-Isoleucin und L-Leucin (je 0,1 g/l) wuchsen.

[0036] Die Enzymaktivität der Dihydroxysäuredehydratase wurde im Rohextrakt dieser Mutanten bestimmt. Dazu wurden die Klone in 60 ml LB-Medium kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde einmal mit 0,05 M Kaliumphosphatpuffer gewaschen und im selben Puffer resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte mittels 10 minütiger Ultraschallbehandlung (Branson-Sonifier W-250, Branson Sonic Power Co, Danbury, USA). Anschließend wurden die Zelltrümmer durch eine 30 minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C abgetrennt und der Überstand als Rohextrakt in den Enzymtest eingesetzt. Der Reaktionsansatz des Enzymtests enthielt 0,2 ml 0,25 M Tris/HCl, pH 8, 0,05 ml Rohextrakt, und 0,15 ml 65 mM alpha,β-Dihydroxy-β-methylvalerat. Die Testansätze wurden bei 30 °C inkubiert, nach 10, 20 und 30 Minuten 200 μ l Proben genommen und deren Ketomethylvaleratkonzentration mittels HPLC-Analytik bestimmt (Hara et al. 1985, Analytica Chimica Acta 172: 167-173). Wie Tabelle 1 zeigt, weist der Stamm R127/7 keine Dihydroxysäuredehydrataseaktivität auf, wogegen die Isomero-reduktase und Acetohydroxysäuresynthase Aktivitäten als weitere Enzyme der Synthese der verzweigtkettigen Aminosäuren noch vorhanden sind.

Tabelle 1

35 Spezifische Aktivitäten (μ mol/min und mg Protein) verschiedener Enzyme in <i>C. glutamicum</i> Stämmen			
Stamm	Dihydroxysäure dehydratase	Isomero reduktase	Acetohydroxysäure synthase
R127	0,003	0,05	0,07
R127/7	0,000	0,06	0,09

2. Klonierung des ilvD-Gens von *C. glutamicum*

[0037] Chromosomal DNA aus *C. glutamicum* R127 wurde wie bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9 (1990) 84-87) beschrieben isoliert. Diese wurde mit dem Restriktionsenzym Sau3A (Boehringer Mannheim) gespalten und durch Saccharose-Dichte-Gradienten-Zentrifugation (Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press) aufgetrennt. Die Fraktion mit dem Fragmentgrößenbereich von etwa 6-10 kb wurde zur Ligation mit dem Vektor pJC1 (Cremer et al., Molecular and General Genetics 220 (1990) 478-480) eingesetzt. Der Vektor pJC1 wurde hierzu mit BamHI linearisiert und dephosphoryliert. Fünf ng davon wurden mit 20 ng der genannten Fraktion der chromosomal DNA ligiert und damit die Mutante R127/7 durch Elektroporation (Haynes und Britz, FEMS Microbiology Letters 61 (1989) 329-334) transformiert. Die Transformanten wurden auf die Fähigkeit getestet auf CGXII Agarplatten ohne Zugabe der verzweigtkettigen Aminosäuren wachsen zu können. Von über 5000 getesteten Transformanten wuchsen nach Replikaplatzierung und zweitägiger Inkubation bei 30°C 8 Klone auf Minimalmediumplatten. Von diesen Klonen wurden Plasmidpräparationen, wie bei Schwarzer et al. (Bio/Technology (1990) 9: 84-87) beschrieben durchgeführt. Restriktionsanalysen der Plasmid-DNA ergaben, daß in allen 8 Klonen dasselbe Plasmid, im Folgendem pRV genannt, enthalten war. Das Plasmid trägt ein Insert von 4,3 kb und wurde durch Retransformation auf seine Fähigkeit die ilvD-Mutante R127/7 zu komplementieren getestet. Durch Subklonierung

wurde der für die Komplementation der Mutante R127/7 verantwortliche Bereich auf ein 2,9 kb Scal/Xhol-Fragment eingegrenzt.

3. Sequenzierung des ilvD-Gens

[0038] Die Nukleinsäuresequenz des 2,9 kb Scal/Xhol-Fragments wurde nach der Dideoxy-Kettenabbruchmethode von Sanger et al. durchgeführt (Proceedings of the National of Sciences of the United States of America USA (1977) 74: 5463-5467). Dabei wurde der Auto-Read Sequencing kit verwendet (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). Die gelelektrophoretische Analyse erfolgte mit dem automatischen Laser-Fluoreszenz Sequenziergerät (A.L.F.) von Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden). Die erhaltene Nukleotidsequenz wurde mit dem Programm Paket HUSAR (Release 4.0, EMBL, Cambridge, GB) analysiert. Die Nukleotidsequenz ist als ID SEQ NO 4 wiedergegeben. Die Analyse ergab ein offenes Leseraster von 1836 Basenpaaren, das als ilvD-Gen identifiziert wurde und für ein Polypeptid von 612 Aminosäuren kodiert, das als SEQ ID NO 5 wiedergegeben ist.

15 Beispiel 3

Konstruktion einer ilvA Deletionsmutante von *C. glutamicum*

[0039] Der Einbau einer Deletion in das ilvA-Gen von *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 wurde mit dem bei Schäfer et al. (Gene 145: 69-73 (1994)) beschriebenen System zum Genaustausch durchgeführt. Zur Konstruktion des Inaktivierungsvektors pK19mobsacBΔilvA wurde zunächst aus dem auf einem EcoRI-Fragment im Vektor pBM21 (Möckel et al. 1994, Molecular Microbiology 13: 833-842) vorliegenden ilvA-Gen ein internes 241 bp BglII-Fragment entfernt. Hierzu wurde der Vektor mit BglII geschnitten und, nach Abtrennung des ilvA internen BglII-Fragments mittels Agarosegelektrophorese, religiert. Anschließend wurde aus dem Vektor das unvollständige Gen als EcoRI-Fragment isoliert und in den mit EcoRI linearisierten Vektor pK19mobsacB (Schäfer 1994, Gene 145: 69-73) ligiert. Der erhaltene Inaktivierungsvektor pK19mobsacBΔilvA wurde durch Transformation in den *E. coli* Stamm S 17-1 eingebracht (Hanahan 1983, Journal of Molecular Biology 166: 557-580) und per Konjugation nach *C. glutamicum* ATCC13032 transferiert (Schäfer et al. 1990, Journal of Bacteriology 172: 1663-1666). Es wurden Kanamycin-resistente Klone von *C. glutamicum* erhalten, bei denen der Inaktivierungsvektor im Genom integriert vorlag. Um auf die Excision des Vektors zu selektionieren, wurden Kanamycin-resistente Klone auf Saccharose-haltigem LB-Medium ((Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press)) mit 15 g/l Agar, 2% Glucose/10% Saccharose) ausplattiert und Kolonien erhalten, welche den Vektor durch ein zweites Rekombinationsereignis wieder verloren haben (Jäger et al. 1992, Journal of Bacteriology 174: 5462-5465). Durch Überimpfen auf Minimalmediumplatten (Medium CGXII mit 15 g/l Agar (Keilhauer et al., Journal of Bacteriology 175 (1993) 5595-5603)) mit und ohne 2 mM L-Isoleucin, bzw. mit und ohne 50 µg/ml Kanamycin wurden 36 Klone isoliert, welche durch die Excision des Vektors Kanamycin sensitiv und Isoleucin auxotroph waren und bei denen nun das unvollständige ilvA Gen (ΔilvA-Allel) im Genom vorlag. Einer dieser Klone wurde als Stamm ATCC13032ΔilvA bezeichnet und weiter verwendet.

40 Beispiel 4

Expression der Gene ilvBN, ilvC und ilvD in *C. glutamicum*

[0040] Die Gene der Acetohydroxsäuresynthase (ilvBN) und der Isomeroreduktase (ilvC) (Cordes et al. 1992, Gene 112: 113-116 und Keilhauer et al. 1993, Journal of Bacteriology 175: 5595-5603) und der Dihydroxsäuredehydratase (ilvD) (Beispiel 2) wurden zur Expression in den Vektor pECM3 kloniert. Der Vektor pECM3 ist ein Derivat von pECM2 (Jäger et al. 1992, Journal of Bacteriology 174: 5462-5465), das durch Deletion des ca. 1 kbp langen BamHI/BglII DNA-Fragments entstand, welches das Kanamycinresistenzgen trägt.

[0041] In dem Vektor pKK5 (Cordes et al. 1992, Gene 112: 113-116) lagen die Gene ilvBNC bereits im Vektor pJC1 (Cremer et al. 1990, Molecular and General Genetics 220: 478-480) kloniert vor. Aus diesem wurde ein 5,7 kb XbaI-ilvBNC-Fragment isoliert und zusammen mit einem, das ilvD-Gen enthaltende, 3,1 kb-XbaI Fragment des Vektors pRV in den mit XbaI linearisierten Vektor pECM3 eingebracht. Der Ligationsansatz wurde hierbei in den *E. coli* Stamm DH5αmcr transformiert. Aus einer Transformante vom Typ DH5αmcr/pECM3ilvBNC wurde das Plasmid pECM3ilvBNC (Abbildung 3) erhalten.

[0042] Mittels Elektroporation (Haynes 1989, FEMS Microbiology Letters 61: 329-334) und Selektion auf Chloramphenicolresistenz wurde das Plasmid pECM3ilvBNC in den Stamm ATCC13032ΔilvA eingebracht und der Stamm ATCC13032ΔilvA/pECM3ilvBNC erhalten. Weiterhin wurde mittels Elektroporation (Haynes 1989, FEMS Microbiology Letters 61: 329-334) und Selektion auf Kanamycinresistenz das Plasmid pEKEx2panBC in den Stamm ATCC13032 und in den Stamm ATCC13032ΔilvA eingebracht und die Stämme ATCC13032/pEKEx2panBC und

ATCC13032ΔilvA/pEKEx2panBC erhalten. In den Stamm ATCC13032ΔilvA/pECM3ilvBNCD wurden mittels Elektroporation (Haynes 1989, FEMS Microbiology Letters 61: 329-334) und Selektion auf Kanamycin und Chloramphenicol die Plasmide pEKEx2panBC und pEKEx2 eingebracht. Auf diese Weise entstanden die Stämme ATCC13032ΔilvA/pECM3ilvBNCD pEKEx2 und ATCC13032ΔilvA/pECM3ilvBNCD pEKEx2panBC.

5

Beispiel 5

Konstruktion einer Pantothenensäure bedürftigen panC-Mutante von *C. glutamicum*

10 [0043] Es wurde mit Hilfe des Inaktivierungsvektors pK18mob (Schäfer et al. 1994, Gene 145: 69-73) eine *C. glutamicum* R127 panC Mutante erzeugt.
 [0044] Zur Konstruktion des panC-Inaktivierungsvektors wurde zunächst ein 168 bp großes, zentrales Fragment des panC-Gens (Nukleotid 265-432 des 837 bp umfassenden Gens) von *C. glutamicum* mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Als Matrize diente hier der Vektor pUR1 (s. Beispiel 6); als Primer wurden die beiden 15 20mere Primer 1 und Primer 2 eingesetzt: Primer 1 5' GTTCGCACCCGATGTGGAGG 3', Primer 2 5' ATGCACGAT-CAGGGCGCACC 3'. Die PCR wurde nach Sambrook et al. (Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press) mit einer Annealingtemperatur von 55°C durchgeführt. Das erhaltene Fragment wurde nach Zwischenklonierung in die SmaI Schnittstelle des Vektors pUC18, als EcoRI/Sall Fragment gerichtet in den Inaktivierungsvektor pK18mob (Schäfer et al. 1994, Gene 145: 69-73) ligiert. Der so erhaltene Vektor pK18mob'panC' wurde 20 zur Transformation des *E. coli*-Stammes S 17-1 benutzt und nachfolgend per Konjugation in *C. glutamicum* R127 eingebracht. Durch Selektion auf Kanamycinresistenz wurden so Klone von *C. glutamicum* R127 erhalten, bei denen der Integrationsvektor durch ein homologes Rekombinationsereignis ins panC-Gen integriert ist. Der so erhaltene Stamm R12YpanC::pK18mob'panC' ist zur D-Pantothenatbestimmung geeignet.

25

Quantitative Bestimmung von D-Pantothenat

30 [0045] Zur quantitativen Bestimmung von D-Pantothenat wurde die *C. glutamicum* panC Mutante R127panC::pK18mob'panC' konstruiert (siehe Beispiel 5), deren Wachstum direkt von der D-Pantothenat Konzentration des Mediums abhängig ist. Dieser Stamm ist Pantothenensäure auxotroph und zeigt bei Supplementation mit β-Alanin und D-Pantoat kein Wachstum.
 [0046] Zur Bestimmung von Pantothenat mit diesem Indikatorstamm wurde CGXII-Medium (Keilhauer et al., Journal of Bacteriology (1993) 175: 5595-5603) als Testmedium eingesetzt. Dazu wurden je 3 ml 4/3 fach konzentriertes 35 CGXII-Medium in einem Inkubationsröhrlchen (Falcon 2057, Becton and Dickinson, New Jersey, USA) mit 1 ml Pantothenensäure-haltiger, steriler Eich- oder Probelösung versetzt und mit dem Indikatorstamm inkuliert. Als Inokulum wurden jeweils 60 µl einer Glyzerinkultur des Indikatorstammes eingesetzt. Nach 40 stündiger Inkubation bei 30°C wurde die Zelldichte (OD₆₀₀) (Novaspec 4049 Spectrophotometer, LKB Biochrom, Cambridge, GB) der Testansätze bestimmt und mittels einer Eichkurve die Pantothenensäurekonzentration ermittelt. Der Stamm weist bis zu einer Konzentration von 40 25 µg/l eine lineare Abhängigkeit des Wachstums von der Pantothenatkonzentration auf, bei einer optischen Dichte von 0,5 bis 10. Zur Herstellung der Glyzerinkultur des Indikatorstammes wurde dieser Stamm auf unsupplementiertem CGXII-Medium 24 Stunden inkubiert (Aushungerung an D-Pantothenat). 1050 µl der Kultur wurden anschließend mit 700 µl Glyzerin versetzt. Von dieser bei -70°C zwischengefrorenen Glyzerinkultur wurden 60 µl zu Bestimmung von D-Pantothenat, wie zuvor beschrieben benutzt. Als Referenz wurde Na-Pantothenat verwendet, das von der Firma Sigma 45 (Deisenhofen, Deutschland) bezogen wurde.

Beispiel 7

Produktion von D-Pantothenat mit verschiedenen *C. glutamicum* Stämmen

50

[0047] Zur Untersuchung ihrer Pantothenatbildung wurden die Stämme ATCC13032, ATCC13032/pEKEx2panBC, ATCC13032ΔilvA und ATCC13032ΔilvA/pEKEx2panBC in 60 ml Brain Heart Infusion-Medium (Difco Laboratories, Detroit, USA) für 14 Stunden bei 30°C vorkultiviert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 0,9% NaCl-Lösung (w/v) gewaschen und mit dieser Suspension je 60 ml CgXII-Medium so angeimpft, daß die OD₆₀₀ von 0,5 betrug. Das 55 Medium war identisch mit dem bei Keilhauer et al., (Journal of Bacteriology (1993) 175: 5595-5603) beschriebenen Medium, enthielt aber zusätzlich 2 mM L-Isoleucin. Das von Keilhauer et al. beschriebene Medium CgXII ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2

Zusammensetzung des Mediums CGXII	
Komponente	Konzentration
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20 g/L
Harnstoff	5 g/L
KH_2PO_4	1 g/L
K_2HPO_4	1 g/L
$\text{Mg}_2\text{O}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,25 g/L
3-Morpholinopropansulfon-säure	42 g/L
CaCl_2	10 mg/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	10 mg/L
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10 mg/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	1 mg/L
CuSO_4	0,2 mg/L
$\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,02 mg/L
Biotin (pH7)	0,2 mg/L
Glukose	40 g/L
Protokatechusäure	0,03 mg/L

[0048] Bei der Kultivierung der Stämme ATCC13032/pEKEx2panBC und Stammes ATCC13032ΔilvA/pEKEx2panBC wurde das Medium nach 5 Stunden zusätzlich mit 1 mM Isopropylthio-β-D-galactosid versetzt. Nach 24 stündiger Kultivierung wurden Proben genommen, die Zellen abzentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert. Die Pantothenatkonzentration des Überstands wurde mit Hilfe des im Beispiel 6 beschriebenen Pantothenat-tests bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3

D-Pantothenatbildung in verschiedenen <i>C. glutamicum</i> Stämmen	
Stamm	D-Pantothenat (mg/l)
ATCC13032	0,01
ATCC13032/pEKEx2panBC	0,03
ATCC13032ΔilvA	0,06
ATCC13032ΔilvA/pEKEx2panBC	0,3

Beispiel 9

Produktion von D-Pantothenat mit verschiedenen *C. glutamicum* Stämmen bei β-Alanin Zugabe

[0049] Zur Quantifizierung der Pantothenatbildung wurden die Stämme ATCC13032ΔilvA/pECM3ilvBNCD pEKEx2 und ATCC13032ΔilvA/pECM3ilvBNCD pEKEx2panBC in 60 ml Brain Heart Infusion-Medium(Difco Laboratories, Detroit, USA) mit 25 mg/l Kanamycin und 3 mg/l Chloramphenicol für 14 Stunden bei 30°C vorkultiviert, zweimal mit 0,9% NaCl-Lösung (w/v) gewaschen und mit dieser Suspension je 60 ml CgXII-Medium so angeimpft, daß die OD₆₀₀ 0,5 betrug. Das Medium enthielt hierbei 2 mM L-Isoleucin, 25 mg/l Kanamycin, 3 mg/l Chloramphenicol und β-Alanin in

EP 1 006 189 A2

einer Endkonzentration von 20 mM. Nach 5 stündiger Kultivierung wurde dem Medium jeweils IPTG (Isopropylthio- β -D-galactosid) in einer Endkonzentration von 1 mM zugefügt. Nach 49 und 74 Stunden wurde eine Probe entnommen, die Zellen wurden abzentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert. Die Pantothenatkonzentration des Überstands wurde wie in Beispiel 6 beschrieben bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

5

Tabelle 4

D-Pantothenatakkumulation in verschiedenen Stämmen von <i>C. glutamicum</i>			
Stamm	D-Pantothenat [mg/l] nach einer Inkubationszeit von		
	49 Stunden	74 Stunden	
ATCC13032 Δ ilvA/pECM3ilvBNCD pEKEx2	80	100	
ATCC13032 Δ ilvA/pECM3ilvBNCD pEKEx2panBC	920	980	

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

SEQUENZPROTOKOLL

5 (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: Degussa Aktiengesellschaft
(B) STRASSE: Weissfrauenstr. 9
10 (C) ORT: Frankfurt am Main
(D) BUNDESLAND: Hessen
(E) LAND: Deutschland
(F) POSTLEITZAHL: D-60311

15 (A) NAME: Forschungszentrum Juelich GmbH
(B) STRASSE: Leo-Brandt Strasse
(C) ORT: Juelich
(D) BUNDESLAND: Nordrhein-Westfalen
20 (E) LAND: Deutschland
(F) POSTLEITZAHL: D-52425

25 (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Verfahren zur
fermentativen Herstellung von D-Pantothensaure
unter Verwendung coryneformer Bakterien

30 (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 5

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

35 (A) DATENTRAEGER: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version
#1.30 (EPA)

40 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

45 (A) LAENGE: 2164 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Doppelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

50 (ii) ART DES MOLEKUELS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

55 (vi) URSPRUNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Corynebacterium glutamicum
(B) STAMM: ATCC13032

5 (ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLUESSEL: CDS
 (B) LAGE: 351..1163
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /codon_start= 351
 /EC_number= 4.1.2.12
 /product=
 "Ketopantoathydroxymethyltransferase"
 /gene= "panB"

10 (ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLUESSEL: CDS
 (B) LAGE: 1166..2002
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /codon_start= 1166
 /EC_number= 6.3.2.1
 /product= "Pantothenatsynthetase"
 /gene= "panC"

15 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

20	GCTTCGGGGT ACCAATTCTT TTAAGAACCA TCAGATCAAT CTGTTGTACA TTCTCGGCCA GATTCAGCTT TTCGTAAGG ACGAAACACT TTCACTTGAA TCGGCAGCAA AGTTTCTTAA	60 120
25	AGTTTCTAAG GCAACTGCAA CGAGGTATTT TAGAACTCTC CGAGAAATGG AATTAGTTCA CGAGGTCAGC AAACGCCCTT TGCGGTTTGC GCTCACGGAT AAAGGTGCGTG AGATAGTAGG TCTTGAGGTA AAAATTTGAC TCCATAACGA GAACTTAATC GAGCAACACC CCTGAACAGT GAATCAAATC GGAATTTATT TATTCTGAGC TGGTCATCAC ATCTATACTC ATG CCC	180 240 300 356
	Met Pro	1
30	ATG TCA GGC ATT GAT GCA AAG AAA ATC CGC ACC CGT CAT TTC CGC GAA Met Ser Gly Ile Asp Ala Lys Lys Ile Arg Thr Arg His Phe Arg Glu 5 10 15	404
35	GCT AAA GTA AAC GGC CAG AAA GTT TCG GTT CTC ACC AGC TAT GAT GCG Ala Lys Val Asn Gly Gln Lys Val Ser Val Leu Thr Ser Tyr Asp Ala 20 25 30	452
40	CTT TCG GCG CGC ATT TTT GAT GAG GCT GGC GTC GAT ATG CTC CTT GTT Leu Ser Ala Arg Ile Phe Asp Glu Ala Gly Val Asp Met Leu Leu Val 35 40 45 50	500
45	GGT GAT TCC GCT GCC AAC GTT GTG CTG GGT CGC GAT ACC ACC TTG TCG Gly Asp Ser Ala Ala Asn Val Val Leu Gly Arg Asp Thr Thr Leu Ser 55 60 65	548
	ATC ACC TTG GAT GAG ATG ATT GTG CTG GCC AAG GCG GTG ACG ATC GCT Ile Thr Leu Asp Glu Met Ile Val Leu Ala Lys Ala Val Thr Ile Ala 70 75 80	596
	ACG AAG CGT GCG CTT GTG GTG GTT GAT CTG CCG TTT GGT ACC TAT GAG Thr Lys Arg Ala Leu Val Val Asp Leu Pro Phe Gly Thr Tyr Glu 85 90 95	644
	GTG AGC CCA AAT CAG GCG GTG GAG TCC GCG ATC CGG GTC ATG CGT GAA Val Ser Pro Asn Gln Ala Val Glu Ser Ala Ile Arg Val Met Arg Glu 100 105 110	692
	ACG GGT GCG GCT GCG GTG AAG ATC GAG GGT GGC GTG GAG ATC GCG CAG	740

50

55

EP 1 006 189 A2

	Thr Gly Ala Ala Ala Val Lys Ile Glu Gly Gly Val Glu Ile Ala Gln		
	115 120 125 130		
5	ACG ATT CGA CGC ATT GTT GAT GCT GGA ATT CCG GTT GTC GGC CAC ATC	788	
	Thr Ile Arg Arg Ile Val Asp Ala Gly Ile Pro Val Val Gly His Ile		
	135 140 145		
	GGG TAC ACC CCG CAG TCC GAG CAT TCC TTG GGC GGC CAC GTG GTT CAG	836	
	Gly Tyr Thr Pro Gln Ser Glu His Ser Leu Gly Gly His Val Val Gln		
10	150 155 160		
	GGT CGT GGC GCG AGT TCT GGA AAG CTC ATC GCC GAT GCC CGC GCG TTG	884	
	Gly Arg Gly Ala Ser Ser Gly Lys Leu Ile Ala Asp Ala Arg Ala Leu		
	165 170 175		
15	GAG CAG GCG GGT GCG TTT GCG GTT GTG TTG GAG ATG GTT CCA GCA GAG	932	
	Glu Gln Ala Gly Ala Phe Ala Val Val Leu Glu Met Val Pro Ala Glu		
	180 185 190		
	GCA GCG CGC GAG GTT ACC GAG GAT CTT TCC ATC ACC ACT ATC GGA ATC	980	
	Ala Ala Arg Glu Val Thr Glu Asp Leu Ser Ile Thr Thr Ile Gly Ile		
	195 200 205 210		
20	GGT GCC GGC AAT GGC ACA GAT GGG CAG GTT TTG GTG TGG CAG GAT GCC	1028	
	Gly Ala Gly Asn Gly Thr Asp Gly Gln Val Leu Val Trp Gln Asp Ala		
	215 220 225		
	TTC GGC CTC AAC CGC GGC AAG AAG CCA CGC TTC GTC CGC GAG TAC GCC	1076	
	Phe Gly Leu Asn Arg Gly Lys Lys Pro Arg Phe Val Arg Glu Tyr Ala		
25	230 235 240		
	ACC TTG GGC GAT TCC TTG CAC GAC GCC GCG CAG GCC TAC ATC GCC GAT	1124	
	Thr Leu Gly Asp Ser Leu His Asp Ala Ala Gln Ala Tyr Ile Ala Asp		
	245 250 255		
30	ATC CAC GCG GGT ACC TTC CCA GGC GAA GCG GAG TCC TTT TA ATG CAG	1171	
	Ile His Ala Gly Thr Phe Pro Gly Glu Ala Glu Ser Phe Met Gln		
	260 265 270 1		
	GTA GCA ACC ACA AAG CAG GCG CTT ATC GAC GCC CTC CTC CAC CAC AAA	1219	
	Val Ala Thr Thr Lys Gln Ala Leu Ile Asp Ala Leu Leu His His Lys		
	5 10 15		
35	TCC GTC GGG CTC GTC CCC ACC ATG GGT GCG CTA CAC AGC GGA CAC GCC	1267	
	Ser Val Gly Leu Val Pro Thr Met Gly Ala Leu His Ser Gly His Ala		
	20 25 30		
40	TCG TTG GTT AAA GCA GCA CGC GCT GAA AAC GAC ACT GTT GTA GCC AGT	1315	
	Ser Leu Val Lys Ala Ala Arg Ala Glu Asn Asp Thr Val Val Ala Ser		
	35 40 45 50		
	ATT TTT GTC AAT CCC CTG CAG TTT GAA GCA CTC GGT GAT TGC GAT GAT	1363	
	Ile Phe Val Asn Pro Leu Gln Phe Glu Ala Leu Gly Asp Cys Asp Asp		
	55 60 65		
45	TAC CGC AAC TAT CCC CGC CAA CTC GAC GCC GAT TTA GCA CTG CTT GAA	1411	
	Tyr Arg Asn Tyr Pro Arg Gln Leu Asp Ala Asp Leu Ala Leu Leu Glu		
	70 75 80		
	GAG GCA GGT GTG GAT ATT GTG TTC GCA CCC GAT GTG GAG GAA ATG TAC	1459	
	Glu Ala Gly Val Asp Ile Val Phe Ala Pro Asp Val Glu Glu Met Tyr		
	85 90 95		
50	CCC GGT GGC TTG CCA CTA GTG TGG GCG CGC ACC GGT TCC ATC GGA ACA	1507	
	Pro Gly Gly Leu Pro Leu Val Trp Ala Arg Thr Gly Ser Ile Gly Thr		
	100 105 110		

EP 1 006 189 A2

	AAA TTG GAG GGT GCC AGC AGG CCT GGC CAT TTC GAT GGT GTG GCT ACC Lys Leu Glu Gly Ala Ser Arg Pro Gly His Phe Asp Gly Val Ala Thr 115 120 125 130	1555
5	GTG GTG GCG AAG CTG TTC AAT TTG GTG CGC CCT GAT CGT GCA TAT TTT Val Val Ala Lys Leu Phe Asn Leu Val Arg Pro Asp Arg Ala Tyr Phe 135 140 145	1603
	GGA CAA AAA GAT GCT CAG CAG GTT GCG GTG ATT CGG CGA TTG GTT GCC Gly Gln Lys Asp Ala Gln Gln Val Ala Val Ile Arg Arg Leu Val Ala 150 155 160	1651
10	GAT CTA GAC ATT CCC GTG GAG ATT CGT CCC GTT CCG ATT ATT CGT GGC Asp Leu Asp Ile Pro Val Glu Ile Arg Pro Val Pro Ile Ile Arg Gly 165 170 175	1699
	GCC GAT GGC TTA GCC GAA TCC AGC CGC AAT CAA CGT CTT TCT GCG GAT Ala Asp Gly Leu Ala Glu Ser Ser Arg Asn Gln Arg Leu Ser Ala Asp 180 185 190	1747
15	CAG CGA GCG CAA GCT CTG GTG CTG CCG CAG GTG TTG AGT GGG TTG CAG Gln Arg Ala Gln Ala Leu Val Leu Pro Gln Val Leu Ser Gly Leu Gln 195 200 205 210	1795
20	CGT CGA AAA GCA GCT GGT GAA GCG CTA GAT ATC CAA GGT GCG CGC GAC Arg Arg Lys Ala Ala Gly Glu Ala Leu Asp Ile Gln Gly Ala Arg Asp 215 220 225	1843
	ACC TTG GCC AGC GCC GAC GGC GTG CGC TTG GAT CAC CTG GAA ATT GTC Thr Leu Ala Ser Ala Asp Gly Val Arg Leu Asp His Leu Glu Ile Val 230 235 240	1891
25	GAT CCA GCC ACC CTC GAA CCA TTA GAA ATC GAC GGC CTG CTC ACC CAA Asp Pro Ala Thr Leu Glu Pro Leu Glu Ile Asp Gly Leu Leu Thr Gln 245 250 255	1939
	CCA GCG TTG GTG GTC GGC GCG ATT TTC GTG GGG ECG GTG CGG TTG ATC Pro Ala Leu Val Val Gly Ala Ile Phe Val Gly Pro Val Arg Leu Ile 260 265 270	1987
30	GAC AAT ATC GAG CTC TAGTACCAAC CCTGCGTTGC AGCACGCAGC TTCCGATAAC Asp Asn Ile Glu Leu 275	2042
	GCGTGCTCAG CTCAGTGTGTT TTAGGTGCGC GGTGCGGATC GGAACCGGGA GTTGGCCACT GCGGTGGCGT GGCTCACCC GACAGCGCCC ATGCCGCCTG ACGAGCTGCA CCCAACGCCA	2102
	CA	2162
35		2164
40	(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:	
	(i) SEQUENZKENNZEICHEN: (A) LAENGE: 271 Aminosaeuren (B) ART: Aminosaeure (D) TOPOLOGIE: linear	
45	(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:	
	Met Pro Met Ser Gly Ile Asp Ala Lys Lys Ile Arg Thr Arg His Phe 1 5 10 15	
50	Arg Glu Ala Lys Val Asn Gly Gln Lys Val Ser Val Leu Thr Ser Tyr 20 25 30	
	Asp Ala Leu Ser Ala Arg Ile Phe Asp Glu Ala Gly Val Asp Met Leu	

EP 1 006 189 A2

35 40 45

5 Leu Val Gly Asp Ser Ala Ala Asn Val Val Leu Gly Arg Asp Thr Thr
50 55 60

Leu Ser Ile Thr Leu Asp Glu Met Ile Val Leu Ala Lys Ala Val Thr
65 70 75 80

Ile Ala Thr Lys Arg Ala Leu Val Val Asp Leu Pro Phe Gly Thr
85 90 95

10 Tyr Glu Val Ser Pro Asn Gln Ala Val Glu Ser Ala Ile Arg Val Met
100 105 110

Arg Glu Thr Gly Ala Ala Ala Val Lys Ile Glu Gly Gly Val Glu Ile
115 120 125

15 Ala Gln Thr Ile Arg Arg Ile Val Asp Ala Gly Ile Pro Val Val Gly
130 135 140

His Ile Gly Tyr Thr Pro Gln Ser Glu His Ser Leu Gly Gly His Val
145 150 155 160

20 Val Gln Gly Arg Gly Ala Ser Ser Gly Lys Leu Ile Ala Asp Ala Arg
165 170 175

Ala Leu Glu Gln Ala Gly Ala Phe Ala Val Val Leu Glu Met Val Pro
180 185 190

25 Ala Glu Ala Ala Arg Glu Val Thr Glu Asp Leu Ser Ile Thr Thr Ile
195 200 205

Gly Ile Gly Ala Gly Asn Gly Thr Asp Gly Gln Val Leu Val Trp Gln
210 215 220

30 Asp Ala Phe Gly Leu Asn Arg Gly Lys Pro Arg Phe Val Arg Glu
225 230 235 240

Tyr Ala Thr Leu Gly Asp Ser Leu His Asp Ala Ala Gln Ala Tyr Ile
245 250 255

Ala Asp Ile His Ala Gly Thr Phe Pro Gly Glu Ala Glu Ser Phe
260 265 270

35 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

40 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LAENGE: 279 Aminosaeuren
 (B) ART: Aminosaeure
 (D) TOPOLOGIE: linear

45 (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

45 Met Gln Val Ala Thr Thr Lys Gln Ala Leu Ile Asp Ala Leu Leu His
1 5 10 15

50 His Lys Ser Val Gly Leu Val Pro Thr Met Gly Ala Leu His Ser Gly
20 25 30

55 His Ala Ser Leu Val Lys Ala Ala Arg Ala Glu Asn Asp Thr Val Val
35 40 45

50 Ala Ser Ile Phe Val Asn Pro Leu Gln Phe Glu Ala Leu Gly Asp Cys
50 55 60

55 Asp Asp Tyr Arg Asn Tyr Pro Arg Gln Leu Asp Ala Asp Leu Ala Leu

55

EP 1 006 189 A2

5	65	70	75	80
	Leu Glu Glu Ala Gly Val Asp Ile Val Phe Ala Pro Asp Val Glu Glu			
	85		90	95
10	Met Tyr Pro Gly Gly Leu Pro Leu Val Trp Ala Arg Thr Gly Ser Ile			
	100		105	110
	Gly Thr Lys Leu Glu Gly Ala Ser Arg Pro Gly His Phe Asp Gly Val			
	115		120	125
15	Ala Thr Val Val Ala Lys Leu Phe Asn Leu Val Arg Pro Asp Arg Ala			
	130		135	140
	Tyr Phe Gly Gln Lys Asp Ala Gln Gln Val Ala Val Ile Arg Arg Leu			
	145		150	160
20	Val Ala Asp Leu Asp Ile Pro Val Glu Ile Arg Pro Val Pro Ile Ile			
	165		170	175
	Arg Gly Ala Asp Gly Leu Ala Glu Ser Ser Arg Asn Gln Arg Leu Ser			
	180		185	190
25	Ala Asp Gln Arg Ala Gln Ala Leu Val Leu Pro Gln Val Leu Ser Gly			
	195		200	205
	Leu Gln Arg Arg Lys Ala Ala Gly Glu Ala Leu Asp Ile Gln Gly Ala			
	210		215	220
30	Arg Asp Thr Leu Ala Ser Ala Asp Gly Val Arg Leu Asp His Leu Glu			
	225		230	240
	Ile Val Asp Pro Ala Thr Leu Glu Pro Leu Glu Ile Asp Gly Leu Leu			
	245		250	255
	Thr Gln Pro Ala Leu Val Val Gly Ala Ile Phe Val Gly Pro Val Arg			
	260		265	270
	Leu Ile Asp Asn Ile Glu Leu			
	275			

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

35 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LAENGE: 2952 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Doppelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

40 (ii) ART DES MOLEKUELS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

45 (vi) URSPRUNGLICHE HERKUNFT:
(A) ORGANISMUS: Corynebacterium glutamicum
(B) STAMM: ATCC13032
(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: MUTANTE R127

50 (ix) MERKMALE:
(A) NAME/SCHLUESSEL: CDS
(B) LAGE: 290..2125
(D) SONSTIGE ANGABEN: /codon_start= 290
/EC_number= 4.2.1.9
/product= "Dihydroxysaeuredehydratase"
/gene= "ilvD"

EP 1006 189 A2

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

5	AGTACTTGG A CGCCAAAAG GCACTGGCA AGCCAGTTCA GTTGAACCTC GATGACGACA	60
	CCGATGGAA TACAACACAA ACAGAAAGCG TTGAATCCCAGAGAGACCGGA CAAGCCGCGT	120
	CTGAAACCTC ACATCGTGAT AACCTGCGT CACAGCACTA GAGTGTAAATA AGCCGTCCGA	180
	ACCAAAGGTC CACACCTCTG CACGAGTAGA AGCTCACCCA AGTTTCAAA GTGCCGTTGA	240
10	TTCTTGACAA CCACCCGCCG CTCTTTAGAG CAGATTGAA AAGCGCATC ATG ATC Met Ile 280	295
	CCA CTT CGT TCA AAA GTC ACC ACC GTC GGT CGC AAT GCA GCT GGC GCT Pro Leu Arg Ser Lys Val Thr Thr Val Gly Arg Asn Ala Ala Gly Ala 285 290 295	343
15	CGC GCC CTT TGG CGT GCC ACC GGC ACC AAG GAA AAT GAG TTC GGC AAG Arg Ala Leu Trp Arg Ala Thr Gly Thr Lys Glu Asn Glu Phe Gly Lys 300 305 310	391
20	CCA ATT GTT GCC ATC GTA AAC TCC TAC ACC CAG TTC GTG CCC GGA CAC Pro Ile Val Ala Ile Val Asn Ser Tyr Thr Gln Phe Val Pro Gly His 315 320 325	439
	GTT CAC CTT AAG AAC GTC GGC GAT ATT GTG GCA GAT GCA GTG CGC AAA Val His Leu Lys Asn Val Gly Asp Ile Val Ala Asp Ala Val Arg Lys 330 335 340 345	487
25	GCC GGT GGC GGT CCA AAG GAA TTC AAC ACC ATC GTC GAT GAC GGC ATC Ala Gly Gly Val Pro Lys Glu Phe Asn Thr Ile Val Asp Asp Gly Ile 350 355 360	535
	GCC ATG GGA CAC GGC GGC ATG CTG TAC TCC CTG CCA TCC CGT GAA ATC Ala Met Gly His Gly Met Leu Tyr Ser Leu Pro Ser Arg Glu Ile 365 370 375	583
30	ATC GCC GAC TCC GTC GAA TAC ATG GTC AAC GCA CAC ACC GCC GAC GGC Ile Ala Asp Ser Val Glu Tyr Met Val Asn Ala His Thr Ala Asp Ala 380 385 390	631
	ATG GTG TGT ATC TCC AAC TGT GAC AAG ATC ACC CCA GGC ATG CTC AAC Met Val Cys Ile Ser Asn Cys Asp Lys Ile Thr Pro Gly Met Leu Asn 395 400 405	679
35	GCA GCA ATG CGC CTG AAC ATC CCA GTG GTC TTC GTT TCC GGT GGC CCA Ala Ala Met Arg Leu Asn Ile Pro Val Val Phe Val Ser Gly Gly Pro 410 415 420 425	727
40	ATG GAA GCT GGC AAG GCT GTC GTC GTT GAG CGC GTT GCA CAC GCA CCA Met Glu Ala Gly Lys Ala Val Val Glu Arg Val Ala His Ala Pro 430 435 440	775
	ACC GAC CTC ATC ACC GCG ATC TCC GCA TCC GCA AGC GAT GCA GTC GAC Thr Asp Leu Ile Thr Ala Ile Ser Ala Ser Ala Ser Asp Ala Val Asp 445 450 455	823
45	GAC GCA GGC CTT GCA GCC GTT GAA CGA TCC GCA TGC CCA ACC TGT GGC Asp Ala Gly Leu Ala Ala Val Glu Arg Ser Ala Cys Pro Thr Cys Gly 460 465 470	871
50	TCC TGC TCC GGT ATG TTC ACC GCG AAC TCC ATG AAC TGC CTC ACC GAA Ser Cys Ser Gly Met Phe Thr Ala Asn Ser Met Asn Cys Leu Thr Glu 475 480 485	919
	GCT CTG GGA CTT TCT CTC CCG GGC AAC GGC TCC ACT CTG GCA ACC CAC	967

EP 1006 189 A2

	Ala Leu Gly Leu Ser Leu Pro Gly Asn Gly Ser Thr Leu Ala Thr His		
	490 495 500 505		
5	GCA GCA CGT CGC GCA CTG TTT GAA AAG GCC GGC GAA ACC GTC GTT GAA Ala Ala Arg Arg Ala Leu Phe Glu Lys Ala Gly Glu Thr Val Val Glu 510 515 520		1015
	CTG TGC CGC CGC TAC TAC GGT GAA GAA GAC GAA TCC GTT CTG CCA CGT Leu Cys Arg Arg Tyr Tyr Gly Glu Glu Asp Glu Ser Val Leu Pro Arg 525 530 535		1063
10	GGC ATT GCC ACC AAG AAG GCA TTC GAA AAC GCA ATG GCA CTG GAT ATG Gly Ile Ala Thr Lys Lys Ala Phe Glu Asn Ala Met Ala Leu Asp Met 540 545 550		1111
	GCC ATG GGT GGA TCC ACC AAC ACC ATC CTC CAC ATC CTC GCA GCT GCC Ala Met Gly Gly Ser Thr Asn Thr Ile Leu His Ile Leu Ala Ala Ala 555 560 565		1159
15	CAG GAA GGC GAA GTT GAC TTC GAC CTC GCA GAC ATC GAC GAA CTG TCC Gln Glu Gly Glu Val Asp Phe Asp Leu Ala Asp Ile Asp Glu Leu Ser 570 575 580 585		1207
20	AAA AAC GTC CCC TGC CTG TCC AAG GTT GCA CCA AAC TCC GAC TAC CAC Lys Asn Val Pro Cys Leu Ser Lys Val Ala Pro Asn Ser Asp Tyr His 590 595 600		1255
	ATG GAA GAC GTC CAC CGC GCC GGT CGC ATT CCA GCA CTG CTC GGC GAG Met Glu Asp Val His Arg Ala Gly Arg Ile Pro Ala Leu Leu Gly Glu 605 610 615		1303
25	CTC AAC CGC GGT GGC CTG CTG AAC AAG GAC GTC CAC TCC GTT CAC TCC Leu Asn Arg Gly Gly Leu Leu Asn Lys Asp Val His Ser Val His Ser 620 625 630		1351
	AAC GAC CTT GAA GGT TGG TTG GAT GAC TGG GAT ATC CGC TCT GGC AAG Asn Asp Leu Glu Gly Trp Leu Asp Asp Trp Asp Ile Arg Ser Gly Lys 635 640 645		1399
30	ACC ACC GAA GTA GCA ACC GAA CTC TTC CAC GCA GCC CCA GGT GGC ATC Thr Thr Glu Val Ala Thr Glu Leu Phe His Ala Ala Pro Gly Gly Ile 650 655 660 665		1447
	CGC ACC ACC GAA GCA TTC TCC ACC GAG AAC CGC TGG GAC GAA CTC GAC Arg Thr Thr Glu Ala Phe Ser Thr Glu Asn Arg Trp Asp Glu Leu Asp 670 675 680		1495
35	ACC GAC GCT GCC AAG GGC TGC ATC CGC GAC GTT GAA CAC GCC TAC ACC Thr Asp Ala Ala Lys Gly Cys Ile Arg Asp Val Glu His Ala Tyr Thr 685 690 695		1543
40	GCC GAC GGC GGC CTG GTT CTT CGC GGC AAC ATC TCC CCT GAC GGC Ala Asp Gly Gly Leu Val Val Leu Arg Gly Asn Ile Ser Pro Asp Gly 700 705 710		1591
	GCA GTG ATC AAG TCC GCA GGT ATC GAA GAA GAG CTG TGG AAC TTC ACC Ala Val Ile Lys Ser Ala Gly Ile Glu Glu Leu Trp Asn Phe Thr 715 720 725		1639
45	GGA CCA GCA CGA GTT GTC GAA AGC CAG GAA GAG GCA GTC TCT GTC ATC Gly Pro Ala Arg Val Val Glu Ser Gln Glu Glu Ala Val Ser Val Ile 730 735 740 745		1687
	CTG ACC AAG ACC ATC CAA GCT GGC GAA GTT CTG GTC GTC CGC TAC GAA Leu Thr Lys Thr Ile Gln Ala Gly Glu Val Leu Val Val Arg Tyr Glu 750 755 760		1735
50	GGC CCA TCA GGT GGA CCA GGC ATG CAG GAA ATG CTT CAC CCA ACC GCA		1783

EP 1 006 189 A2

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

5 Met Ile Pro Leu Arg Ser Lys Val Thr Thr Val Gly Arg Asn Ala Ala
1 5 10 15

Gly Ala Arg Ala Leu Trp Arg Ala Thr Gly Thr Lys Glu Asn Glu Phe
20 25 30

10 Gly Lys Pro Ile Val Ala Ile Val Asn Ser Tyr Thr Gln Phe Val Pro
35 40 45

Gly His Val His Leu Lys Asn Val Gly Asp Ile Val Ala Asp Ala Val
50 55 60

15 Arg Lys Ala Gly Gly Val Pro Lys Glu Phe Asn Thr Ile Val Asp Asp
65 70 75 80

Gly Ile Ala Met Gly His Gly Gly Met Leu Tyr Ser Leu Pro Ser Arg
85 90 95

Glu Ile Ile Ala Asp Ser Val Glu Tyr Met Val Asn Ala His Thr Ala
100 105 110

20 Asp Ala Met Val Cys Ile Ser Asn Cys Asp Lys Ile Thr Pro Gly Met
115 120 125

Leu Asn Ala Ala Met Arg Leu Asn Ile Pro Val Val Phe Val Ser Gly
130 135 140

25 Gly Pro Met Glu Ala Gly Lys Ala Val Val Val Glu Arg Val Ala His
145 150 155 160

Ala Pro Thr Asp Leu Ile Thr Ala Ile Ser Ala Ser Ala Ser Asp Ala
165 170 175

30 Val Asp Asp Ala Gly Leu Ala Ala Val Glu Arg Ser Ala Cys Pro Thr
180 185 190

Cys Gly Ser Cys Ser Gly Met Phe Thr Ala Asn Ser Met Asn Cys Leu
195 200 205

35 Thr Glu Ala Leu Gly Leu Ser Leu Pro Gly Asn Gly Ser Thr Leu Ala
210 215 220

Thr His Ala Ala Arg Arg Ala Leu Phe Glu Lys Ala Gly Glu Thr Val
225 230 235 240

40 Val Glu Leu Cys Arg Arg Tyr Tyr Gly Glu Glu Asp Glu Ser Val Leu
245 250 255

Pro Arg Gly Ile Ala Thr Lys Lys Ala Phe Glu Asn Ala Met Ala Leu
260 265 270

45 Asp Met Ala Met Gly Gly Ser Thr Asn Thr Ile Leu His Ile Leu Ala
275 280 285

Ala Ala Gln Glu Gly Glu Val Asp Phe Asp Leu Ala Asp Ile Asp Glu
290 295 300

Leu Ser Lys Asn Val Pro Cys Leu Ser Lys Val Ala Pro Asn Ser Asp
305 310 315 320

50 Tyr His Met Glu Asp Val His Arg Ala Gly Arg Ile Pro Ala Leu Leu
325 330 335

Gly Glu Leu Asn Arg Gly Gly Leu Leu Asn Lys Asp Val His Ser Val

Abbildung 2:
Restriktionskarte des Plasmids pEKEx2panBC.

Abbildung 3:
5 Restriktionskarte des Plasmids pECM3ilvBNCD.

Patentansprüche

1. In Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium* replizierbare, gegebenenfalls rekombinante DNA mit der Herkunft *Corynebacterium*, die zumindest eine der folgenden Nucleotidsequenzen enthält, ausgewählt aus der Gruppe:
 - 10 a) codierend für das panB-Gen (Ketopantoathydroxymethyltransferase), dargestellt in der SEQ-ID-No.1,
 - b) codierend für das panC-Gen (Pantothenatsynthetase), dargestellt in der SEQ-ID-No.1, insbesondere das panBC-Operon und gegebenenfalls
 - 15 c) codierend für das ilvD-Gen (Dihydroxysäuredehydratase), dargestellt durch die SEQ-ID-No.4.
2. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 1 mit:
 - 20 (i) den Nucleotidsequenzen, gezeigt in SEQ-ID-No.1, SEQ-ID-No.4,
 - (ii) mindestens einer dieser Sequenzen, die den jeweiligen Sequenzen (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes entsprechen oder
 - 25 (iii) mindestens einer dieser Sequenzen, die mit den zu jeweiligen Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen hybridisieren und gegebenenfalls.
 - (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in i).
- 30 3. Mikroorganismen, insbesondere der Gattung *Corynbacterium*, transformiert durch die Einführung einer oder mehrerer der replizierbaren DNA gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2.
4. Pendelvектор (shuttle vector) pECM3ilvBNCD, gekennzeichnet
- 35 durch die in der Abb. 3 wiedergegebene Restriktionskarte, hinterlegt als *E.coli DH5αmcr/pECM3ilvBNCD* unter der Bezeichnung DSM 12457.
5. Pendelvектор (shuttle vector) pEKEx2panBC, gekennzeichnet
- 40 durch die in der Abb.2 wiedergegebene Restriktionskarte, hinterlegt als *E.coli DH5αmcr/pEKEx2panBC* unter der Bezeichnung DSM 12456.
- 45 6. Verfahren zur Herstellung von Pantothenäure, dadurch gekennzeichnet,
daß man in den Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium* das panB- und panC-Gen und gegebenenfalls weitere für die entsprechenden Enzyme codierenden Nucleotidsequenzen verstärkt (überexprimiert) und 50 diese Mikroorganismen zur Fermentation einsetzt.
7. Verfahren zur Herstellung gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet,
daß man zusätzlich das ilvD-Gen verstärkt (überexprimiert).
- 55 8. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet,

EP 1 006 189 A2

daß man zusätzlich die Gene ilvBNCD verstärkt (überexprimiert).

9. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 oder 7,
dadurch gekennzeichnet,

5 daß man zur Erzielung der Verstärkung die Kopienzahl der Gene bzw. Nucleotidsequenzen in den Mikroorganismen durch Transformation mit diesen Gene bzw. Nucleotidsequenzen tragenden Plasmidvektoren erhöht.

10 10. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 oder 7,
dadurch gekennzeichnet,

daß man zur Erzielung der Verstärkung die sich stromaufwärts des Strukturgens befindende Promoter- und Regulationsregion mutiert.

15 11. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 oder 7,
dadurch gekennzeichnet,

daß man zur Erzielung der Verstärkung stromaufwärts des Strukturgens Expressionskassetten einbaut.

20 12. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 oder 7,
dadurch gekennzeichnet,

25 daß man zur Erzielung der Verstärkung die Lebensdauer der mRNA, die von den oben genannten Sequenzen als Matrize abgelesen wird, verlängert und/oder den Abbau der (des) entsprechenden Enzymproteins(e) verhindert.

13. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 bis 12,
dadurch gekennzeichnet,

30 daß man die Gene gemäß Anspruch 1 in Corynebacterien überexprimiert, die weitere Metabolit- bzw. Antimetabolit-Resistenzmutationen aufweisen.

14. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 bis 12,
dadurch gekennzeichnet,

35 35 daß man zur Erzielung der Überexpression das Kulturmedium und/oder die Fermentationsführung ändert.

15. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 bis 14,
dadurch gekennzeichnet,

40 daß man zumindest einen der Stoffwechselwege in den Mikroorganismen ausgeschaltet, die die Pantothenat-(Pantothenäure)-bildung verringern.

16. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 bis 15,
dadurch gekennzeichnet,

daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen man zusätzlich zu einem oder mehreren der Gene die übrigen Gene des Stoffwechselweges der Pantothenäurebildung, einzeln oder gemeinsam, überexprimiert.

50 17. Verfahren gemäß Anspruch 15,
dadurch gekennzeichnet,

daß man im Stoffwechselweg das ilvA-Gen ausschaltet.

55 18. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 6 bis 17,
dadurch gekennzeichnet,

daß man Mikroorganismen der Gattung Corynebacterium einsetzt, die den Pendelvektor pECM3ilvBNCD ent-

halten.

19. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 6 bis 17,
dadurch gekennzeichnet,

5 daß man Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium* einsetzt, die den Pendelvektor pEKEx2panBC ent-
halten.

10 20. Verfahren zur Herstellung von Pantothensäure durch Fermentation von Mikroorganismen der Gattung *Corynebac-*
terium gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß man

15 a) zumindest eines der Gene panB oder panC, bevorzugt panBC, gegebenenfalls in Kombination mit dem ilvD-
Gen, verstärkt (überexprimiert), und
b) die Pantothensäure im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen anreichert, und
c) die Pantothensäure isoliert.

20 21. Verfahren gemäß den Ansprüchen 19 und 20,
dadurch gekennzeichnet,

25 daß man während der Fermentation eine Vorstufe der Pantothensäure zusetzt, ausgewählt aus der Gruppe
Aspartat, β -Alanin, Ketoisovalerat, Ketopantoat oder Pantoat.

30

35

40

45

50

55

Abbildung 2

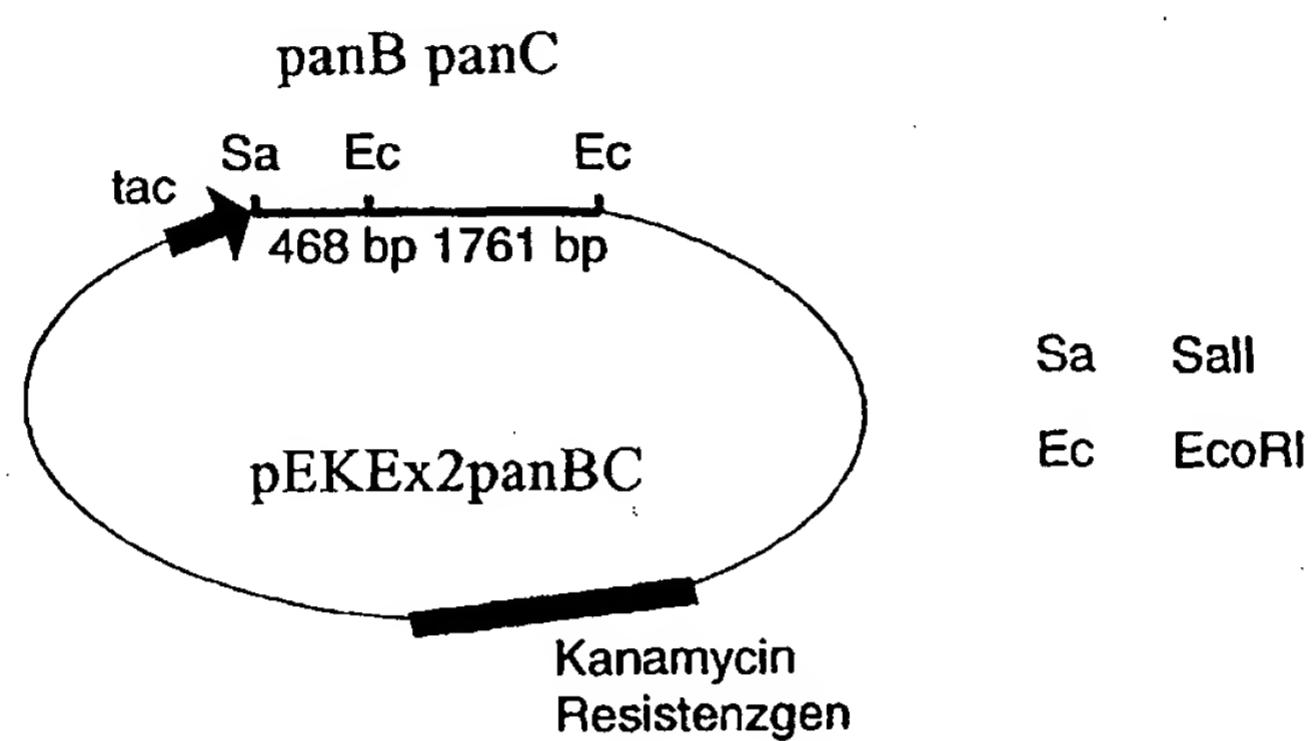
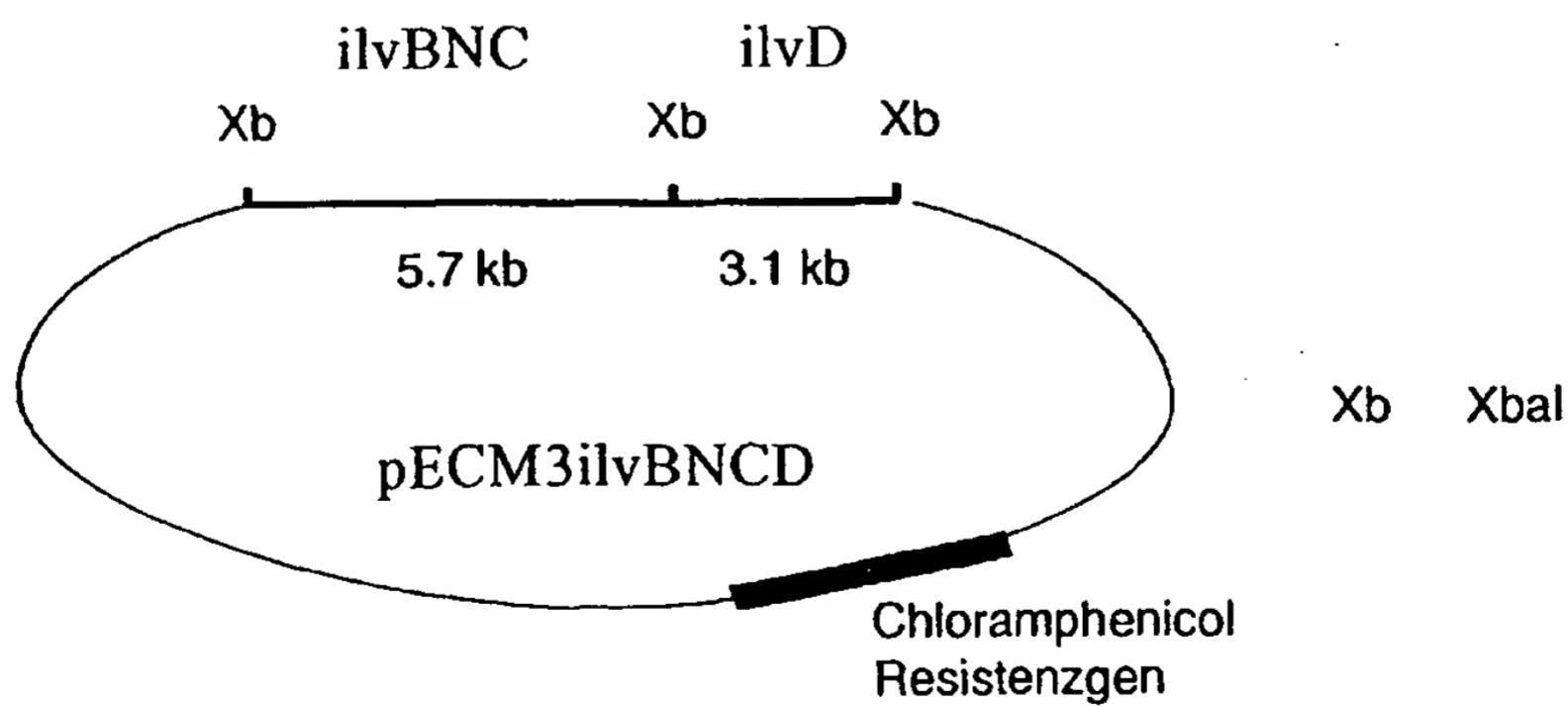


Abbildung 3





(19)

Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 1 006 189 A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
07.06.2000 Patentblatt 2000/23

(51) Int. Cl.⁷: C12N 15/52, C12N 15/54,
C12N 15/60, C12N 15/77,
C12P 13/02
// C12N1/21, (C12R1/15, 1:19)

(21) Anmeldenummer: 99123738.9

(22) Anmeldetag: 30.11.1999

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE

Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: 01.12.1998 DE 19855312

(71) Anmelder:
• Degussa-Hüls Aktiengesellschaft
60287 Frankfurt am Main (DE)

• FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH
52425 Jülich (DE)

(72) Erfinder:

- Eggeling, Lothar, Dr.
52428 Jülich (DE)
- Thierbach, Georg, Dr.
33613 Bielefeld (DE)
- Sahm, Herrmann, Prof.Dr.
52428 Jülich (DE)

(54) Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothensäure unter Verwendung coryneformer Bakterien

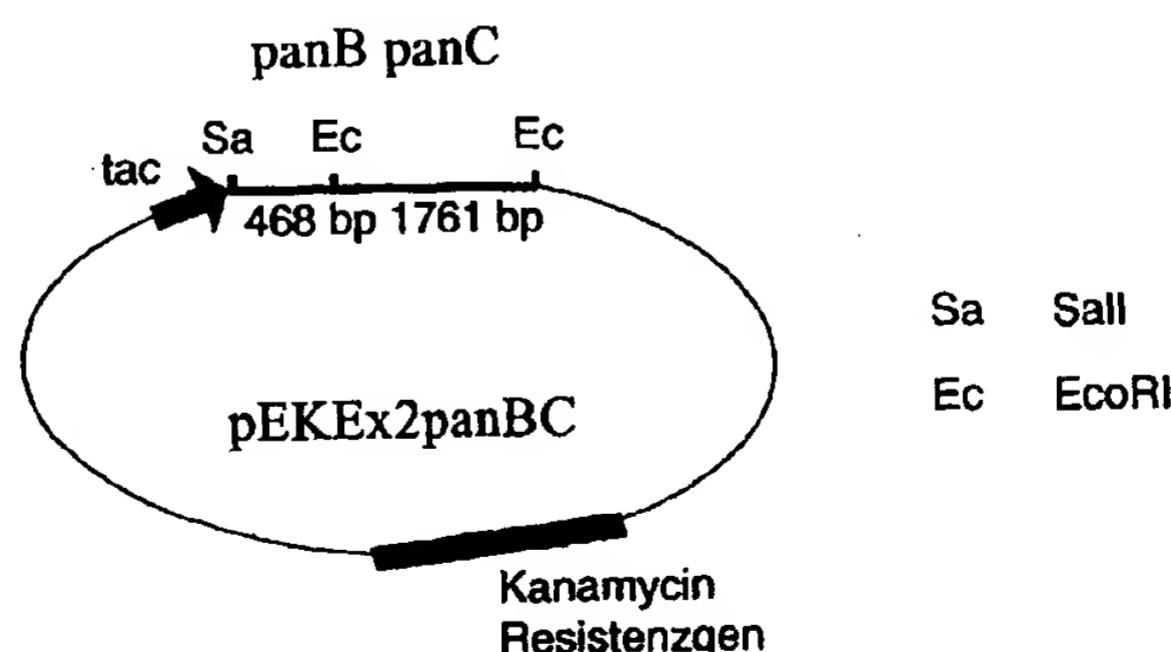
(57) Die Erfindung betrifft in Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium* replizierbare, gegebenenfalls rekombinante DNA mit der Herkunft *Corynebacterium*, die zumindest eine der folgenden Nucleotidsequenzen enthält, ausgewählt aus der Gruppe:

a) codierend für das panB-Gen (Ketopantoathydroxymethyltransferase), dargestellt in der SEQ-ID-No.1,
No.1,
b) codierend für das panC-Gen (Pantothenatsyn-

thetase), dargestellt in der SEQ-ID-No.1, insbesondere das panBC-Operon und gegebenenfalls c) codierend für das ilvD-Gen (Dihydroxsäuredehydratase), dargestellt durch die SEQ-ID-No.4,

und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothensäure unter Verwendung von Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium*, in denen die genannten Gene verstärkt werden.

Abbildung 2



EP 1 006 189 A2

Description

Prior art

Pantothenic acid is a vitamin of commercial importance which is used in cosmetics, medicine, human nutrition and livestock nutrition.

Pantothenic acid can be prepared by chemical synthesis or biotechnologically by fermentation of suitable microorganisms in suitable nutrient solutions. The advantage of biotechnological preparation by microorganisms is that the desired stereoisomeric D form of pantothenic acid is produced.

Various species of bacteria, such as, for example, *Escherichia coli*, *Corynebacterium erythrogenes*, *Brevibacterium ammoniagenes* and yeasts such as, for example, *Debaromyces castellii* are able, as shown in EP-A-0 493 060, to produce D-pantothenic acid in a nutrient solution containing glucose, DL-pantoic acid and β -alanine. EP-A-0 493 060 further shows that the formation of D-pantothenic acid is improved in *Escherichia coli* through amplification of pantothenic acid biosynthesis genes using the plasmids pFV3 and pFV5.

EP-A-0 590 857 relates to strains of *Escherichia coli* which harbor resistances to various antimetabolites such as, for example, salicylic acid, α -ketobutyric acid, β -hydroxyaspartic acid etc., and produce D-pantoic acid and D-pantothenic acid in a nutrient solution containing glucose and β -alanine. It is further described in EP-0 590 857 that the production of D-pantoic acid and D-pantothenic acid in *E. coli* can be improved by amplification of pantothenic acid biosynthesis genes from *E. coli* which are not defined in detail and which are present on the plasmid pFV31.

WO 97/10340 further shows that pantothenic acid production can be further increased in *Escherichia coli* mutants forming pantothenic acid by increasing the activity of the enzyme acetohydroxy acid synthase II, an enzyme of valine biosynthesis.

Object of the invention

The inventors have made it their object to provide new bases for improved processes for the production of D-pantothenic acid by fermentation using coryneform bacteria.

Description of the invention

The vitamin pantothenic acid is a product of commercial importance which is used in cosmetics, medicine, human nutrition and livestock nutrition. There is thus a general interest in providing improved processes for the production of pantothenic acid.

Mention of D-pantothenic acid or pantothenic acid or pantothenate in the following text means not only the free acid but also the salts of D-pantothenic acid such as, for example, the calcium, sodium, ammonium or potassium salt.

The invention relates to DNA which is replicable in microorganisms of the genus *Corynebacterium*, is recombinant where appropriate and is of *Corynebacterium* origin, and which comprises at least one of the following nucleotide sequences selected from the group:

- a) coding for the panB gene (ketopantoate hydroxymethyltransferase) depicted in SEQ ID No. 1,
- b) coding for the panC gene (pantothenate synthetase) depicted in SEQ ID No. 1, in particular the panBC operon and, where appropriate,
- c) coding for the ilvD gene (dihydroxy acid dehydratase) depicted by SEQ ID No. 4.

The invention likewise relates to replicable DNA as claimed in said claim 1 having:

- (i) the nucleotide sequences shown in SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 4,
- (ii) at least one of these sequences which correspond to the respective sequences (i) within the range of degeneracy of the genetic code or
- (iii) at least one of these sequences which hybridize with sequences complementary to the respective sequences (i) or (ii) and, where appropriate,
- (iv) functionally neutral sense mutations in (i).

Likewise claimed are coryneform microorganisms, in particular of the genus *Corynebacterium*, transformed by the introduction of one or more replicable DNA fragments.

The invention also relates to a process for the production of D-pantothenic acid using in particular coryneform bacteria which already produce this acid and in which the panB and panC genes are amplified, in particular overexpressed, singly or combined together, where appropriate combined with a defect mutation in the ilvA gene or an amplification of the ilvBN, ilvC or ilvD genes.

The term "amplification" describes in this connection the increase in the intracellular activity of one or more enzymes in a microorganism which are encoded by appropriate DNA, by, for example, increasing the copy number of the gene or genes, using a strong promoter or using a gene which codes for a corresponding enzyme with high activity and, where appropriate, combining these measures.

The microorganisms to which the present invention relates are able to produce pantothenic acid from glucose, sucrose, lactose, fructose, maltose, molasses, starch, cellulose or from glycerol and ethanol, in particular from glucose or sucrose. They are coryneform bacteria, for example of the genera *Corynebacterium* or *Arthrobacter*. In the genus *Corynebacterium*, particular mention should be made of the *Corynebacterium glutamicum* which is known amongst skilled workers for its ability to produce amino acids. To this species belong wild-type strains such as, for example, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, *Brevibacterium flavum* ATCC14067, *Corynebacterium melassecola* ATCC17965 and strains derived therefrom.

The inventors have found that D-pantothenate is produced in an improved manner after amplification, in particular overexpression, of the newly isolated D-pantothenate biosynthesis genes *panB* and *panC*, singly or together (*panBC* operon) from *Corynebacterium glutamicum*, which code for the enzymes ketopantoate hydroxymethyltransferase and pantothenate synthetase.

The inventors have further found that enhanced expression of the novel valine biosynthesis gene *ilvD* from *Corynebacterium glutamicum*, which codes for the enzyme dihydroxy acid dehydratase, contributes to increased D-pantothenate production. Increased D-pantothenate production is brought about according to the invention not only by this gene but also by enhanced expression of the *ilvBN* genes which code for the enzyme acetohydroxy acid synthase, and of the *ilvC* gene which codes for the enzyme isomeroreductase, in *Corynebacterium glutamicum*.

To achieve amplification (overexpression), for example the copy number of the appropriate genes is increased or the promoter and regulatory region which is located upstream of the structural gene is mutated. Expression cassettes incorporated upstream of the structural gene act in the same way. It is additionally possible to increase the expression during the production of D-pantothenate in a fermentation by inducible promoters. Expression is likewise improved by measures which extend the life span of the m-RNA. The enzymic activity is likewise enhanced by preventing breakdown of the enzyme protein. The genes or gene constructs are either present in plasmid vectors with varying copy number or integrated and amplified in the chromosome. A further possible alternative is to achieve overexpression of the relevant genes by changing the medium composition and management of the culture. Instructions concerning this are to be found by the skilled worker inter alia in Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), in Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya and Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), in Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in the European Patent EP 0 472 869, in the US Patent 4,601,893, in Schwarzer and Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), in Reinscheid et al. (Applied and Environmental

Microbiology 60, 126-132 (1994)), in LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in the patent application WO 96/15246, in Jensen and Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)) or in the handbook "Manual and Methods for General Bacteriology of the American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) and in well-known textbooks of genetics and molecular biology.

The panB and panC genes are isolated from *C. glutamicum* by firstly setting up a gene bank of this microorganism in *E. coli*. The setting up of gene banks is set forth in generally known textbooks and handbooks. Mention may be made, as example, of the textbook of Winnacker: *Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie* (Verlag Chemie, Weinheim, Germany, 1990) or the handbook by Sambrook et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989). A well-known gene bank is that of the *E. coli* K-12 strain W3110, which was set up by Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in λ vectors. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) describe a gene bank of *C. glutamicum* ATCC13032 which was set up in the *E. coli* K-12 strain NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) with the aid of the cosmid vector SuperCos 1 (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164). A gene bank of *C. glutamicum* in *E. coli* can also be produced by using plasmids such as pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) or pUC19 (Norlander et al., 1983, Gene, 26:101-106). Particularly suitable hosts are those *E. coli* strains which are restriction and recombination deficient. One example thereof is the strain DH5 α mcr, which was described by Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649).

The gene bank is subsequently introduced into an indicator strain by transformation (Hanahan, Journal of Molecular Biology 166, 557-580, 1983) or electroporation (Tauch et al., 1994, FEMS Microbiological Letters, 123:343-347). The indicator strain is distinguished by having in the gene of interest a mutation which gives rise to a detectable phenotype, for example an auxotrophy. The indicator strains or mutants are obtainable from published sources or collections of strains or are, where appropriate, self-produced. The *E. coli* mutant DV39 (Vallari and Rock, Journal of Bacteriology 1985, 164:136-142), which harbors a mutation in the panC gene, is of particular interest for the purpose of the present invention. Another example of a pantothenic acid-requiring *E. coli* mutant is the strain SJ2, which harbors a mutation in the panB gene and can be purchased from the genetic stock center of Yale University (New Haven, Connecticut, USA). Another example is the *C. glutamicum* mutant R127/7, which was isolated for the purpose of the present invention and in which the ilvD gene coding for dihydroxy acid dehydratase is

defective. After transformation of the indicator strain, such as, for example, of the panB mutant SJ2, with a recombinant plasmid which harbors the gene of interest, such as, for example, the panB gene, and expression of the relevant gene, the indicator strain becomes prototrophic with regard to the corresponding property, such as, for example, the pantothenic acid requirement.

The gene or DNA fragment isolated in this way can be characterized by determining the sequence as described, for example, by Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA, 74:5463-5467, 1977).

The novel *C. glutamicum* DNA sequence coding for the panB and panC genes was obtained in this way and is, as SEQ ID No. 1, a constituent of the present invention. In addition, the amino acid sequences of the corresponding enzymes have been derived from the available DNA sequence using the methods described above. The resulting amino acid sequence of the panB gene product, namely of ketopantoate hydroxymethyltransferase, is depicted in SEQ ID No. 2, and the resulting amino acid sequence of the panC gene product, namely of pantothenate synthetase, is depicted in SEQ ID No. 3. Also obtained in this way was the novel *C. glutamicum* DNA sequence coding for the ilvD gene, which, as SEQ ID No. 4, is a constituent of the present invention. SEQ ID No. 5 depicts the resulting amino acid sequence of the ilvD gene product, namely of dihydroxy acid dehydratase.

Coding DNA sequences resulting from SEQ ID No. 1 and/or SEQ ID No. 4 through degeneracy of the genetic code are likewise a constituent of the invention. In the same way, DNA sequences which hybridize with SEQ ID No. 1 and/or SEQ ID No. 4 are a constituent of the invention. In addition, conservative amino acid exchanges such as, for example, exchange of glycine for alanine or of aspartic acid for glutamic acid in proteins are known to skilled workers as "sense mutations" which lead to no fundamental change in the activity of the protein, i.e. are functionally neutral. It is further known that modifications at the N and/or C terminus of a protein may negligibly impair or even stabilize its function. Details on this are to be found by the skilled worker *inter alia* in Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), in O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), in Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), in Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) and in well-known textbooks of genetics and molecular biology. Amino acid sequences resulting in a corresponding manner from SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3 and/or SEQ ID No. 5 are likewise a constituent of the invention.

The gene characterized in this way can then be expressed singly or in combination with other ones in a suitable microorganism. A known method for expressing or overexpressing genes consists in amplifying them with the aid of

plasmid vectors which, in addition, may be provided with expression signals. Suitable plasmid vectors are those able to replicate in the appropriate microorganisms. Suitable for *Corynebacterium glutamicum* are, for example, the vectors pEKEx1 (Eikmanns et al., *Gene* 102:93-98 (1991)) or pZ8-1 (European patent 0 375 889) or pEKEx2 (Eikmanns et al. *Microbiology* 140:1817-1828 (1994)) or pECM2 (Jäger et al. *Journal of Bacteriology* 174(16): 5462-5465 (1992)). Examples of such plasmids are pEKEx2panBC and pECM3ilvBNCD, which are present in the strains DH5 α mcr/pEKEx2panBC and DH5 α mcr/pECM3ilvBNCD. The plasmid pEKEx2panBC is an *E. coli/C. glutamicum* shuttle vector harboring the panB and panC genes. The plasmid pECM3ilvBNCD is an *E. coli/C. glutamicum* shuttle vector harboring the ilvBN and ilvC genes in addition to the ilvD gene.

The inventors have further found that amplification of the panB and panC genes singly, together or in combination with the ilvBN, ilvC and ilvD genes has advantageous effects in those microorganisms showing reduced synthesis of the amino acids threonine and isoleucine. This reduced synthesis can be achieved by attenuating or eliminating the corresponding biosynthesis enzymes or activities thereof. Suitable for this purpose are, for example, the enzymes homoserine dehydrogenase, homoserine kinase, threonine synthase or else threonine dehydratase. One possibility for attenuating or eliminating enzymes and their activities is provided by mutagenesis methods.

They include untargeted methods making use of chemical reagents such as, for example, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine or else UV radiation for the mutagenesis, with a subsequent search of the required microorganisms for an L-threonine or L-isoleucine requirement. Methods for inducing mutation and searching for mutants are generally known and can be referred to, for example, in Miller (A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992)) or in the handbook "Manual of Methods for General Bacteriology" of the American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981).

These also include targeted recombinant DNA techniques. These methods can be used, for example, to delete the ilvA gene coding for threonine dehydratase in the chromosome. Suitable methods for this are described by Schäfer et al. (*Gene* (1994) 145: 69-73) or else Link et al. (*Journal of Bacteriology* (1998) 179: 6228-6237). It is also preferable to delete only parts of the gene, or else replace mutated fragments of the threonine dehydratase gene. Deletion or replacement thus achieves a loss or a reduction of threonine dehydratase activity (Möckel et al., (1994) *Molecular Microbiology* 13: 833-842; Morbach et al., (1996) *Applied Microbiology and Biotechnology* 45: 612-620). One example of such a

mutant is the *C. glutamicum* strain ATCC13032ΔilvA, which harbors a deletion in the ilvA gene.

The microorganisms produced according to the invention can be cultivated continuously or batchwise in a batch process or in a fed batch or repeated fed batch process in order to produce pantothenic acid. A summary of known cultivation methods is to be found in the textbook by Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) or in the textbook by Storhas (Bioreactoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)).

The culture medium to be used must meet the requirements of the particular microorganisms in a suitable manner. Descriptions of culture media for various microorganisms are present in the handbook "Manual of Methods for General Bacteriology" of the American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981). It is possible to use, as source of carbon sugars and carbohydrates such as, for example, glucose, sucrose, lactose, fructose, maltose, molasses, starch and cellulose, oils and fats such as, for example, soybean oil, sunflower oil, peanut oil and coconut fat, fatty acids such as, for example, palmitic acid, stearic acid and linoleic acid, alcohols such as, for example, glycerol and ethanol and organic acids such as, for example, acetic acid. These substances can be used singly or as mixtures. It is possible to use as source of nitrogen organic nitrogen-containing compounds such as peptones, yeast extract, meat extract, malt extract, corn steep liquor, soybean flour and urea or inorganic compounds such as ammonium sulfate, ammonium chloride, ammonium phosphate, ammonium carbonate and ammonium nitrate. The sources of nitrogen may be used singly or as mixture. It is possible to use as source of phosphorus potassium dihydrogen phosphate or dipotassium hydrogen phosphate or the corresponding sodium-containing salts. The culture medium must additionally contain salts of metals such as, for example, magnesium sulfate or iron sulfate, which are necessary for growth. Finally, it is possible to employ essential growth substances such as amino acids and vitamins in addition to the abovementioned substances. It is possible beyond this to add to the culture medium, for an additional increase in pantothenic acid production, precursors of pantothenic acid such as, for example, aspartate, β -alanine; ketoisovalerate, ketopantoate, pantoate and, where appropriate, salts thereof. Said starting materials can be added to the culture in the form of a single batch or be fed in during the cultivation in a suitable manner.

The pH of the culture is controlled by employing basic compounds such as sodium hydroxide, potassium hydroxide, ammonia or acidic compounds such as phosphoric acid or sulfuric acid in a suitable manner. Foaming can be controlled by employing antifoams such as, for example, fatty acid polyglycol esters.

To maintain the stability of plasmids it is possible to add to the medium suitable substances having a selective effect, for example antibiotics. Aerobic conditions are maintained by introducing oxygen or oxygen-containing gas mixtures such as, for example, air, into the culture. The temperature of the culture is normally 20°C to 50°C and preferably 25°C to 45°C. The culture is continued until pantothenic acid formation is at a maximum. This aim is normally achieved within 10 hours to 160 hours.

The concentration of pantothenic acid produced can be determined by known methods (Velisek; Chromatographic Science 60, 515-560 (1992)). Normally used for microbiological determination of pantothenic acid is the strain *Lactobacillus plantarum* ATCC8014 (U.S. Pharmacopeia 1980; AOAC International 1980). In addition to this, other test organisms such as, for example, *Pediococcus acidilactici* NCIB6990 are also used for microbiological determination of pantothenate concentrations (Sollberg and Hegna; Methods in Enzymology 62, 201-204 (1979)).

The following microorganisms have been deposited at the Deutsche Sammlung für Mikrorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Germany) in accordance with the Budapest Treaty:

- *Escherichia coli* K12 strain DH5 α mcr/pEKEx2panBC as DSM12456
- *Escherichia coli* K12 strain DH5 α mcr/pECMK3ilvBNCD as DSM12457
- *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 Δ ilvA as DSM12455

Examples

The present invention is explained in detail below by means of examples.

Example 1

Cloning, sequencing and expression of the genes of pantothenate biosynthesis panB and panC from *C. glutamicum*

1. Cloning of the panB and panC genes

Chromosomal DNA of *C. glutamicum* ATCC13032 was isolated as described by Schwarzer and Pühler (Bio/Technology 9 (1990) 84-87) and cut with the restriction endonuclease Sau3A. After fractionation by gel electrophoresis, DNA fragment in a size range from 3 to 7 kb and from 9 to 20 kb were extracted and then ligated into the unique BamHI cleavage site of the vector pBR322. The ligation mixtures were used to transform (Hanahan, Journal of Molecular Biology 166 (1983) 557-580) the *E. coli* strain DH5 α mcr (Grant et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA, 87 (1990) 4645-4649).

Insert-harboring colonies were identified on the basis of their tetracycline sensitivity after transfer to LB agar plates containing 10 µg/ml tetracycline. Plasmid preparations (Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press) of combined clones resulted in the isolation of 8 groups which each contained 400 plasmids with an insert size of 9 to 20 kb and 9 groups which each contained 500 plasmids with an insert size of 3 to 7 kb. The *E. coli* panB mutant SJ2 (Cronan et al. 1982, Journal of Bacteriology 149: 916-922) was transformed with this gene bank by electroporation (Wehrmann et al. 1994, Microbiology 140: 3349-3356). The transformation mixtures were plated out directly onto CGXII medium with 15 g/l agar (Keilhauer et al., Journal of Bacteriology (1993) 175:5595-5603). Plasmid DNA was isolated from clones able to grow without pantothenate supplementation (Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press). It was possible by retransformation to confirm the capability for heterologous complementation of the panB defect of the *E. coli* mutant SJ2 by 8 plasmids.

A restriction mapping of these 8 plasmids was carried out. One of the investigated plasmid vectors, called pUR1 hereinafter, contained an insert with a length of 9.3 kb (Figure 1). Transformation of the *E. coli* panC mutant DV39 (Vallari and Rock 1985, Journal of Bacteriology 164:136-142) revealed that the vector pUR1 was likewise able to complement the panC defect of this mutant.

2. Sequencing of the panB gene and of the panC gene

A fragment 2.2 kb in size of the insert (Figure 1) of pUR1 was sequenced by the dideoxy chain termination method of Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA (1977) 74: 5463-5467). For this purpose, initially subclones were generated using exonuclease III and were sequenced using standard primers (universal and reverse primer supplied by Boehringer Mannheim, Germany). The sequencing mixtures underwent analysis by gel electrophoresis using the automatic laser fluorescence sequencing apparatus (A.L.F.) from Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). The resulting nucleotide sequence was analyzed using the HUSAR program package (Release 4.0, EMBL, Cambridge, GB). The nucleotide sequence is depicted as SEQ ID No. 1. Analysis resulted in identification of two open reading frames. One open reading frame with a length of 813 bp which was identified as the panB gene codes for a polypeptide of 271 amino acids and is depicted as SEQ ID No. 2. The second open reading frame which was identified as the panC gene comprises 837 base pairs. This codes for a polypeptide of 279 amino acids which is depicted as SEQ ID No. 3.

3. Expression of the panB and of the panC gene

The panB and panC genes were cloned into the *C. glutamicum* expression vector pEKEx2 (Eikmanns et al. 1994, Microbiology 140: 1817-1828 (1994)) in which the two genes are under the control of the strong tac promoter which is inducible by IPTG. The cloning was carried out in two steps. In the first place, the start of the panB gene was amplified by PCR. This was done by inserting a SalI cleavage site 19 bp in front of the panB start codon using an appropriate primer (primer 1: 5'GATCGTCGACCATCACATCTACTCATGCC 3'). The second primer was selected so that the panB-internal EcoRI cleavage site was present in the amplified fragment (primer 2: 5'ACCCG ATGTGGCCGACAACC 3'). The PCR was carried out with an annealing temperature of 62°C and with the plasmid pUR1 as template as described by Sambrook et al. (Molecular cloning. A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)). The resulting PCR product with a size of 468 bp was cut with the restriction endonucleases SalI and EcoRI and ligated into the vector pEKEx2 which had been treated in the same way. The ligation mixture was used to transform the *E. coli* strain DH5 α mcr. The vector pEKEx2panB' was isolated from a transformant of the type DH5 α mcr/pEKEx2panB'.

An EcoRI fragment 1761 bp in size and comprising the second half of the panBC cluster was then cut out of the plasmid pUR1 by restriction digestion. This was cloned into the pEKEx2panB' vector which already contained the panB PCR product and had previously been linearized with EcoRI. The corresponding ligation mixture was used to transform the *E. coli* strain DH5 α mcr. The vector pEKEx2panBC (Figure 2), in which the panBC gene cluster is under the control of the tac promoter, was isolated from a transformant of the type DH5 α mcr/pEKEx2panBC.

Example 2

Cloning and sequencing of the *C. glutamicum* ilvD gene which codes for dihydroxy acid dehydratase

1. Isolation of an ilvD mutant of *C. glutamicum*

The strain *C. glutamicum* R127 (Haynes 1989, FEMS Microbiology Letters 61: 329-334) was mutagenized with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (Sambrook et al., Molecular Cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press). This was done by adding 250 μ l of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (5 mg/ml dimethylformamide) to 5 ml of an overnight culture of *C. glutamicum* and incubating at 30°C and 200 rpm for 30 minutes (Adelberg 1958, Journal of Bacteriology 76: 326). The cells were then washed twice with sterile NaCl

solution (0.9%). Replica plating of CGXII minimal medium plates with 15 g/l agar (Keilhauer et al., Journal of Bacteriology 175: 5595-5603) resulted in isolation of mutants which grew only on addition of L-valine, L-isoleucine and L-leucine (0.1 g/l of each).

The enzymic activity of the dihydroxy acid dehydratase was determined in the crude extract of these mutants. This was done by cultivating the clones in 60 ml of LB medium and centrifuging in the exponential growth phase. The cell pellet was washed once with 0.05M potassium phosphate buffer and resuspended in the same buffer. The cells were disrupted by treatment with ultrasound (Branson-Sonifer W-250, Branson Sonic Power Co, Danbury, USA) for 10 minutes. The cell detritus was then removed by centrifugation at 13,000 rpm and 4°C for 30 minutes, and the supernatant was employed as crude extract in the enzyme assay. The reaction mixture for the enzyme assay contained 0.2 ml of 0.25M Tris/HCl, pH 8, 0.05 ml of crude extract and 0.15 ml of 65 mM alpha,β-dihydroxy-β-methylvalerate. The assay mixtures were incubated at 30°C, and 200 µl samples were taken after 10, 20 and 30 minutes and their ketomethylvalerate concentration was determined by HPLC analysis (Hara et al. 1985, Analytica Chimica Acta 172: 167-173). As Table 1 shows, the strain R127/7 displays no dihydroxy acid dehydratase activity, whereas the isomeroreductase and acetohydroxy acid synthase activities are still present as further enzymes of the synthesis of branched-chain amino acids.

Table 1

Specific activities (µmol/min and mg of protein) of various enzymes in <i>C. glutamicum</i> strains			
strain	dihydroxy acid dehydratase	isomeroreductase	acetohydroxy acid synthase
R127	0.003	0.05	0.07
R127/7	0.000	0.06	0.09

2. Cloning of the *ilvD* gene from *C. glutamicum*

Chromosomal DNA from *C. glutamicum* R127 was isolated as described by Schwarzer and Pühler (Bio/Technology 9 (1990) 84-87). It was cleaved with the restriction enzyme Sau3A (Boehringer Mannheim) and fractionated by sucrose density gradient centrifugation (Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press). The fraction with fragments in the size range of about 6-10 kb was employed for ligation with the vector pJC1 (Cremer et al., Molecular and General Genetics 220 (1990) 478-480).

The vector pJC1 was for this purpose linearized with BamHI and dephosphorylated. Five ng thereof were ligated with 20 ng of said fraction of the chromosomal DNA, and this was used to transform the mutant R127/7 by electroporation (Haynes and Britz, FEMS Microbiology Letters 61 (1989) 329-334). The transformants were tested for the ability to grow on CGXII agar plates without addition of the branched-chain amino acids. Of more than 5000 tested transformants, 8 clones grew on minimal medium plates after replica plating and incubation at 30°C for 2 days. Plasmid preparations as described by Schwarzer et al. (Bio/Technology (1990) 9:84-87) were carried out on these clones. Restriction analyses of the plasmid DNA revealed that the same plasmid, called pRV hereinafter, was present in all 8 clones. The plasmid harbors an insert of 4.3 kb and was tested for its ability to complement the *ilvD* mutant R127/7 by retransformation. The region responsible for complementation of the mutant R127/7 was localized by subcloning to a 2.9 kb *Scal*/Xhol fragment.

3. Sequencing of the *ilvD* gene

The nucleic acid sequence of the 2.9 kb *Scal*/Xhol fragment was determined by the dideoxy chain termination method of Sanger et al., (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA (1977) 74:5463-5467). This entails use of the Auto-Read sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). The gel electrophoretic analysis took place with the automatic laser fluorescence sequencing apparatus (A.L.F.) from Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). The resulting nucleotide sequence was analyzed using the HUSAR program package (Release 4.0, EMBL, Cambridge, GB). The nucleotide sequence is depicted as SEQ ID No. 4. Analysis revealed an open reading frame of 1836 base pairs, which was identified as the *ilvD* gene and codes for a polypeptide of 612 amino acids, which is depicted as SEQ ID No. 5.

Example 3

Construction of an *ilvA* deletion mutant of the *C. glutamicum*

Incorporation of a deletion into the *ilvA* gene of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 was carried out using the system for gene replacement described by Schäfer et al., (Gene 145:69-73 (1994)). To construct the inactivation vector pK19mobsacBΔ*ilvA* firstly an internal 241 bp *Bgl*III fragment was deleted from the *ilvA* gene present on an *Eco*RI fragment in the vector pBM21 (Möckel et al. 1994, Molecular Microbiology 13:833-842). This was done by cutting the vector with *Bgl*III and, after removal of the *ilvA*-internal *Bgl*III fragment by agarose gel

electrophoresis, religating. The incomplete gene was then isolated from the vector as EcoRI fragment and ligated into the vector pK19mobsacB (Schäfer 1994, Gene 145:69-73) linearized with EcoRI. The resulting inactivation vector pK19mobsacB Δ ilvA was introduced into the *E. coli* strain S 17-1 by transformation (Hanahan 1983, Journal of Molecular Biology 166: 557-580) and transferred by conjugation to *C. glutamicum* ATCC13032 (Schäfer et al. 1990, Journal of Bacteriology 172: 1663-1666). Kanamycin-resistant clones of *C. glutamicum* in which the inactivation vector was integrated into the genome were obtained. In order to select for excision of the vector, kanamycin-resistant clones were plated out on sucrose-containing LB medium (Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press) with 15 g/l agar, 2% glucose/10% sucrose to result in colonies which have lost the vector again through a second recombination event (Jäger et al. 1992, Journal of Bacteriology 174:5462-5465). Transfer to minimal medium plates (CGXII medium with 15 g/l agar (Keilhauer et al., Journal of Bacteriology 175 (1993) 5595-5603)) with and without 2 mM L-isoleucine, or with and without 50 μ g/ml kanamycin, resulted in the isolation of 36 clones which, due to excision of the vector, were kanamycin-sensitive and isoleucine-auxotrophic and in which the incomplete ilvA gene (Δ ilvA allele) was now present in the genome. One of these clones was called the strain ATCC13032 Δ ilvA and used further.

Example 4

Expression of the ilvBN, ilvC and ilvD genes in *C. glutamicum*

The genes of acetohydroxy acid synthase (ilvBN) and of isomeroreductase (ilvC) (Cordes et al. 1992, Gene 112:113-116 and Keilhauer et al. 1993, Journal of Bacteriology 175: 5595-5603) and of dihydroxy acid dehydratase (ilvD) (Example 2) were cloned into the vector pECM3 for expression. The vector pECM3 is a derivative of pECM2 (Jäger et al. 1992, Journal of Bacteriology 174: 5462-5465) which was produced by deletion of the BamHI/BglIII DNA fragment which is about 1 kbp long and which harbors the kanamycin resistance gene.

The ilvBNC genes are already present cloned in the vector pJC1 (Cremer et al. 1990, Molecular and General Genetics 220: 478-480) in the vector pKK5 (Cordes et al. 1992, Gene 112:113-116). A 5.7 kb XbaIilvBNC fragment was isolated from the latter and introduced together with a 3.1 kb XbaI fragment containing the ilvD gene from the vector pRV into the vector pECM3 which had been linearized with XbaI. The ligation mixture was in this case transformed into the *E. coli* strain DH5 α mcr. The plasmid pECM3ilvBNCD (Figure 3) was obtained from a transformant of the type DH5 α mcr/pECM3ilvBNCD.

The plasmid pECM3ilvBNCD was introduced into the strain ATCC13032 Δ ilvA by electroporation (Haynes 1989, FEMS Microbiology Letters 61:329-334) and selection for chloramphenicol resistance, and the strain ATCC13032 Δ ilvA/pECM3ilvBNCD was obtained. The plasmid pEKEx2panBC was introduced into the strain ATCC13032 and into the strain ATCC13032 Δ ilvA by electroporation (Haynes 1989, FEMS Microbiology Letters 61: 329-334) and selection for kanamycin resistance, and the strains ATCC13032/pEKEx2panBC and ATCC13032 Δ ilvA/pEKEx2panBC were obtained. The plasmids pEKEx2panBC and pEKEx2 were introduced into the strain ATCC13032 Δ ilvA/pECM3ilvBNCD by electroporation (Haynes 1989, FEMS Microbiology Letters 61:329-334) and kanamycin and chloramphenicol selection. This resulted in the strains ATCC13032 Δ ilvA/pECM3ilvBNCD pEKEx2 and ATCC13032 Δ ilvA/pECM3ilvBNCD pEKEx2panBC.

Example 5

Construction of a pantothenic acid-requiring panC mutant of *C. glutamicum*

A *C. glutamicum* R127 panC mutant was generated using the inactivation vector pK18mob (Schäfer et al. 1994, Gene 145:69-73).

The panC inactivation vector was constructed by firstly amplifying a central fragment 168 bp in size of a panC gene (nucleotide 265-432 of the gene which comprises 837 bp) of *C. glutamicum* by the polymerase chain reaction (PCR). The template used in this case was the vector pUR1 (see Example 6); the primers employed were the two 20mers primer 1 and primer 2: primer 1 5' GTTCGCACCCGATGTGGAGG 3', primer 2 5' ATGCACGATCAGGGCGCACC 3'. The PCR was carried out as described by Sambrook et al. (Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press) with an annealing temperature of 55°C. The resulting fragment was, after intermediate cloning into the SmaI cleavage site of the vector pUC18, ligated as EcoRI/Sall fragment aligned into the inactivation vector pK18mob (Schäfer et al. 1994, Gene 145:69-73). The resulting vector pK18mob'panC' was used to transform the *E. coli* strain S 17-1 and then introduced by conjugation into *C. glutamicum* R127. Selection for kanamycin resistance resulted in clones of *C. glutamicum* R127 in which the integration vector is integrated into a panC gene by a homologous recombination event. This resulting strain R12YpanC::pK18mob'panC' is suitable for D-pantothenate determination.

Example 6

Quantitative determination of D-pantothenate

The *C. glutamicum* panC mutant R127panC::pK18mob'panC', whose growth depends directly on the D-pantothenate concentration in the medium, was constructed (see Example 5) for quantitative determination of D-pantothenate. This strain is pantothenic acid-auxotrophic and shows no growth on supplementation with β -alanine and D-pantoate.

CGXII medium (Keilhauer et al., Journal of Bacteriology (1993) 175:5595-5603) was employed as test medium for determining pantothenate with this indicator strain. This was done by adding 1 ml of pantothenic acid-containing sterile calibration or sample solution to a 3 ml portion of 4/3-fold concentrated CGXII medium in an incubation tube (Falcon 2057, Becton and Dickinson, New Jersey, USA) and inoculating with the indicator strain. 60 μ l of a glycerol culture of the indicator strain were employed as inoculum in each case. After incubation at 30°C for 40 hours, the cell density (OD_{600}) (Novaspec 4049 spectrophotometer, LKB Biochrom, Cambridge, GB) of the test mixture was determined, and the pantothenic acid concentration was established using a calibration plot. The strain shows a linear dependence of growth on the pantothenate concentration up to a concentration of 25 μ g/l, with an optical density of from 0.5 to 10. To produce the glycerol culture of the indicator strain, this strain was incubated on unsupplemented CGXII medium for 24 hours (starving of D-pantothenate). 1050 μ l of the culture were then mixed with 700 μ l of glycerol. 60 μ l of this glycerol culture which had been frozen at -70°C were used to determine D-pantothenate as previously described. The reference used was Na pantothenate purchased from Sigma (Deisenhofen, Germany).

Example 7

D-pantothenate production using various *C. glutamicum* strains

Pantothenate formation by the strains ATCC13032, ATCC13032/pEKEx2panBC, ATCC13032 Δ ilvA and ATCC13032 Δ ilvA/pEKEx2panBC was investigated by preculturing them in 60 ml of brain-heart infusion medium (Difco Laboratories, Detroit, USA) at 30°C for 14 hours. The cells were then washed twice with 0.9% NaCl solution (w/v), and this suspension was used to inoculate 60-ml portions of CGXII medium so that the OD_{600} was 0.5. The medium was identical to the medium described by Keilhauer et al., (Journal of Bacteriology (1993) 175:5595-5603) but additionally contained 2 mM L-isoleucine. The medium CGXII described by Keilhauer et al. is shown in Table 2.

Table 2

Composition of the medium CGXII	
Component	Concentration
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20 g/L
Urea	5 g/L
KH_2PO_4	1 g/L
K_2HPO_4	1 g/L
$\text{Mg}_2\text{O}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25 g/L
3-Morpholinopropanesulfonic acid	42 g/L
CaCl_2	10 mg/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 mg/L
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10 mg/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 mg/L
CuSO_4	0.2 mg/L
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.02 mg/L
Biotin (pH 7)	0.2 mg/L
Glucose	40 g/L
Protocatechuic acid	0.03 mg/L

On cultivation of the strains ATCC13032/pEKEx2panBC and ATCC13032 Δ ilvA/pEKEx2panBC, after 5 hours 1 mM isopropyl thio- β -D-galactoside was additionally added to the medium. After cultivation for 24 hours, samples were taken, the cells were centrifuged down, and the supernatant was sterilized by filtration. The pantothenate concentration of the supernatant was determined using the pantothenate test described in Example 6. The results are shown in Table 3.

Table 3

D-pantothenate formation in various <i>C. glutamicum</i> strains	
Strain	D-pantothenate (mg/l)
ATCC13032	0.01
ATCC13032/pEKEx2panBC	0.03
ATCC13032 Δ ilvA	0.06
ATTCC13032 Δ ilvA/pEKEx2panBC	0.3

Example 9

D-pantothenate production using various *C. glutamicum* strains with addition of β -alanine

Pantothenate formation was quantified by preculturing the strains ATCC13032 Δ ilvA/pECM3ilvBNCD pEKEx2 and ATCC13032 Δ ilvA/pECM3ilvBNCD pEKEx2panBC in 60 ml of brain-heart infusion medium (Difco Laboratories, Detroit, USA) with 25 mg/l of kanamycin and 3 mg/l chloramphenicol at 30°C for 14 hours, washing twice with 0.9% NaCl solution (w/v) and using this suspension to inoculate 50-ml portions of CGXII medium so that the OD₆₀₀ was 0.5. The medium in this case contained 2 mM L-isoleucine, 25 mg/l kanamycin, 3 mg/l chloramphenicol and β -alanine in a final concentration of 20 mM. After cultivation for 5 hours, IPTG (isopropyl thio- β -D-galactoside) was added to the medium in each case in a final concentration of 1 mM. A sample was taken after 49 and 74 hours, the cells were centrifuged down, the supernatant was sterilized by filtration. The pantothenate concentration in the supernatant was determined as described in Example 6. The results are shown in Table 4.

Table 4

D-pantothenate accumulation in various <i>C. glutamicum</i> strains		
Strain	D-pantothenate [mg/l] after an incubation time of	
	49 hours	74 hours
ATCC13032 Δ ilvA/pECM3ilvBNCD pEKEx2	80	100
ATCC13032 Δ ilvA/pECM3ilvBNCD pEKEx2panBC	920	980

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT:

- (A) NAME: Degussa Aktiengesellschaft
- (B) STREET: Weissfrauenstr. 9
- (C) CITY: Frankfurt am Main
- (D) FEDERAL STATE: Hessen
- (E) COUNTRY: Germany
- (F) POSTAL CODE: D-60311

- (A) NAME: Forschungszentrum Juelich GmbH
- (B) STREET: Leo-Brandt Strasse
- (C) CITY: Juelich
- (D) FEDERAL STATE: North Rhine-Westphalia
- (E) COUNTRY: Germany
- (F) POSTAL CODE: D-52425

(ii) TITLE OF THE INVENTION: Process for the production of D-pantothenic acid by fermentation using coryneform bacteria

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 5

(iv) COMPUTER-READABLE FORM:

- (A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30
(EPO)

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO. 1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 2164 base pairs
- (B) TYPE: nucleotide
- (C) STRANDEDNESS: double
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: genomic DNA

- (iii) HYPOTHETICAL: no
- (iv) ANTISENSE: no
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
 - (A) ORGANISM: *Corynebacterium glutamicum*
 - (B) STRAIN: ATCC13032
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: CDS
 - (B) LOCATION: 351...1163
 - (D) OTHER INFORMATION: /codon_start = 351
/EC_number = 4.1.2.12
/product =
"ketopantoate hydroxymethyltransferase"
/gene = "panB"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: CDS
 - (B) LOCATION: 1166...2002
 - (D) OTHER INFORMATION: /codon_start = 1166
/EC_number = 6.3.2.1
/product = "pantothenate synthetase"
/gene = "panC"
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO. 1:
[see original for sequence listing]

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO. 2:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 271 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO. 2:

[see original for sequence listing]

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO. 3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 279 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO. 3:

[see original for sequence listing]

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO. 4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 2952 base pairs
- (B) TYPE: nucleotide
- (C) STRANDEDNESS: double
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: genomic DNA

(iii) HYPOTHETICAL: no

(iv) ANTISENSE: no

(vi) ORIGINAL SOURCE:

- (A) ORGANISM: Corynebacterium glutamicum
- (B) STRAIN: ATCC13032
- (C) INDIVIDUAL/ISOLATE: MUTANT R127

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
- (B) LOCATION: 290...2125

(D) OTHER INFORMATION: /codon_start = 290
/EC_number = 4.2.1.9
/product = "dihydroxy acid dehydratase"
/gene = "ilvD"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION FOR SEQ ID No. 4:

[see original for sequence listing]

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO. 5:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 612 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO. 5:

[see original for sequence listing]

Figures

The following figures are appended:

Figure 1:

Restriction mapping of pUR1 and location of the sequenced fragment.

Figure 2:

Restriction map of the plasmid pEKEx2panBC.

Figure 3:

Restriction map of the plasmid pECM3ilvBNCD.

Patent claims

1. DNA which is replicable in microorganisms of the genus *Corynebacterium*, is recombinant where appropriate and is of *Corynebacterium* origin, and which comprises at least one of the following nucleotide sequences selected from the group:
 - a) coding for the *panB* gene (ketopantoate hydroxymethyltransferase) depicted in SEQ ID No. 1,
 - b) coding for the *panC* gene (pantothenate synthetase) depicted in SEQ ID No. 1, in particular the *panBC* operon and, where appropriate,
 - c) coding for the *ilvD* gene (dihydroxy acid dehydratase) depicted by SEQ ID No. 4.
2. Replicable DNA as claimed in claim 1 with:
 - (i) the nucleotide sequences shown in SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 4,
 - (ii) at least one of these sequences which correspond to the respective sequences (i) within the range of degeneracy of the genetic code or
 - (iii) at least one of these sequences which hybridize with sequences complementary to the respective sequences (i) or (ii) and, where appropriate,
 - (iv) functionally neutral sense mutations in (i).
3. A microorganism, in particular of the genus *Corynebacterium*, transformed by introduction of one or more of the replicable DNA as claimed in either of claims 1 or 2.
4. A shuttle vector pECM3ilvBNCD, characterized by the restriction map depicted in Fig. 3 and deposited as *E. coli* DH5 α mcr/pECM2ilvBNCD under the number DSM 12457.
5. A shuttle vector pEKEx2panBC, characterized by the restriction map depicted in Fig. 2 and deposited as *E. coli* DH5 α mcr/pEKEx2panBC under the number DSM 12456.
6. A process for the production of pantothenic acid, which comprises amplification (overexpression) of the *panB* gene and *panC* gene and, where appropriate, other nucleotide sequences coding for the appropriate enzymes in the microorganisms of the genus *Corynebacterium*, and employing these microorganisms for the fermentation.
7. A process for production as claimed in claim 6, wherein the *ilvD* gene is additionally amplified (overexpressed).
8. A process as claimed in claims 6 or 7, wherein the *ilvBNCD* genes are additionally amplified (overexpressed).

9. A process as claimed in claims 6 or 7, wherein the amplification is achieved by increasing the copy number of the genes or nucleotide sequences in the microorganisms by transformation with plasmid vectors harboring these genes or nucleotide sequences.
10. A process as claimed in claims 6 or 7, wherein the amplification is achieved by mutating the promoter and regulatory region located upstream of the structural gene.
11. A process as claimed in claims 6 or 7, wherein the amplification is achieved by incorporating expression cassettes upstream of the structural gene.
12. A process as claimed in claims 6 or 7, wherein the amplification is achieved by extending the life span of the mRNA which is read as template by the abovementioned sequences, and/or preventing the breakdown of the relevant enzyme protein(s).
13. A process as claimed in claims 6 to 12, wherein the genes set forth in claim 1 are overexpressed in corynebacteria which has further metabolite and/or antimetabolite resistance mutations.
14. A process as claimed in claims 6 to 12, wherein the overexpression is achieved by altering the culture medium and/or the fermentation management.
15. A process as claimed in claims 6 to 14, wherein at least one of the metabolic pathways in the microorganisms which reduce pantothenate (pantothenic acid) formation is eliminated.
16. A process as claimed in claims 6 to 15, wherein there is use of microorganisms in which, in addition to one or more of the genes, there is overexpression of the other genes of the metabolic pathway for pantothenic acid formation, singly or together.
17. A process as claimed in claim 15, wherein the *ilvA* gene in the metabolic pathway is eliminated.
18. A process as claimed in one or more of claims 6 to 17, wherein there is use of microorganisms of the genus *Corynebacterium* which comprise the shuttle vector pECM3*ilvBNCD*.
19. A process as claimed in one or more of claims 6 to 17, wherein there is use of microorganisms of the genus *Corynebacterium* which comprise the shuttle vector pEKEx2*panBC*.
20. A process for the production of pantothenic acid by fermentation of microorganisms of the genus *Corynebacterium* as claimed in one or more of the preceding claims, which comprises
 - a) amplification (overexpression) of at least one of the genes *panB* or *panC*, preferably *panBC*, where appropriate in combination with the *ilvD* gene, and

b) concentration of the pantothenic acid in the medium or in the cells of the microorganisms, and

c) isolation of the pantothenic acid.

21. A process as claimed in claims 19 and 20, wherein a precursor of pantothenic acid selected from the group of aspartate, β -alanine, ketoisovalerate, ketopantoate or pantoate is added during the fermentation.

Key to figures:

1. Figure
2. pan BC
2.2 kb
3. kanamycin resistance gene
4. chloramphenicol resistance gene

Method for the fermentative production of D-pantothenic acid using coryneform bacteria

Patent Number: EP1006189
Publication date: 2000-06-07
Inventor(s): SAHM HERRMANN PROF DR (DE); EGELING LOTHAR DR (DE); THIERBACH GEORG DR (DE)
Applicant(s): DEGUSSA (DE); KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH (DE)
Requested Patent: EP1006189
Application Number: EP19990123738 19991130
Priority Number(s): DE19981055312 19981201
IPC Classification: C12N15/52 ; C12N15/54 ; C12N15/60 ; C12N15/77 ; C12P13/02 ; C12N1/21
EC Classification: C12N9/00L, C12N9/10A2, C12N9/88, C12N15/52, C12P13/02
Equivalents: CN1256313, DE19855312, JP2000166580

Abstract

Data supplied from the esp@cenet database - I2

